

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ENDOFIT
PENGHASIL FITASE ASAL TANAMAN JAGUNG
(*Zea mays* L.) BERBASIS GEN 16S rRNA**



Skripsi

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar Sarjana Sains
Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Oleh:

YUNIAR HARVIANTI

NIM. 60300113045

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UIN ALAUDDIN MAKASSAR**

2017

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Mahasiswa yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yuniar Harvianti
NIM : 60300113045
Tempat/Tgl. Lahir : Mulyasri/19 Juni 1995
Jur/Prodi : Biologi/S1
Fakultas : Sains dan Teknologi
Alamat : Villa Samata Sejahtera Blok B 14
Judul : "Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Enzim
Fitase asal Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Berbasis Gen 16S
rRNA".

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah hasil karya sendiri. Jika di kemudian hari terbukti bahwa ia merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Gowa, 26 Juli 2017

Penyusun



Yuniar Harvianti
NIM: 60300113045

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul, "Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Enzim Fitase asal Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Berbasis Gen 16S rRNA", yang disusun oleh Yuniar Harvianti, NIM: 60300113045, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang *munawasyah* yang diselenggarakan pada hari Rabu, tanggal 26 Juli 2017, bertepatan dengan 2 Dzulqa'dah 1438 H, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Ilmu Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi.

Samata-Gowa, 26 Juli 2017 M

2 Dzulqa'idah 1438 H

DEWAN PENGUJI :

Ketua	: Dr. Wasilah, ST., MT	(.....)
Sekretaris	: Hasyimuddin, S.Si., M.Si.	(.....)
Munaqisy I	: Dr.Cut Muthiadin, S.Si., M.Si.	(.....)
Munaqisy II	: Ar. Syarif Hidayat, S.Si., M.Kes.	(.....)
Munaqisy III	: Prof.Dr.H.Arifuddin, M.Ag.	(.....)
Pembimbing I	: Hafsan, S.Si, M Pd	(.....)
Pembimbing II	: Isna Rasdianah Azis, S.Si., M.Sc.	(.....)

Diketahui oleh:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar,



Prof.Dr.H.Arifuddin, M.Ag.

NIP. 19710412 200003 1 001


PERSETUJUAN PEMBIMBING

Pembimbing penulisan skripsi Saudari **Yuniar Harvianti**, NIM: 60300113045, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, setelah meneliti dan mengoreksi dengan seksama skripsi yang berjudul “Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Enzim Fitase asal Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Berbasis Gen 16S rRNA”, memandang bahwa hasil penelitian skripsi tersebut telah memenuhi syarat-syarat ilmiah dan dapat disetujui untuk diajukan ke sidang *munaqasyah*.

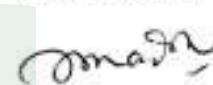
Demikian persetujuan ini diberikan untuk diproses lebih lanjut.

Samata-Gowa, 10 Agustus 2017

Pembimbing I


Hafsan S.Si., M.Pd
NIP.19810912200912 2 008

Pembimbing II


Isna Rasdiana Azis S.Si., M.Sc.
NIDN. 2026078401

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji bagi Allah yang telah melapangkan dada hamba-hambanya karena pengabdian yang baik kepada-Nya. Dan diberikan keutamaan bagi mereka berupa Al-Qur'an yang memang menyimpan berbagai fadhilah yang sangat besar yang dapat diperoleh dengan membacanya dan juga pula mengamalkannya. Segala puji atas kebesaran Allah swt. yang telah menciptakan alam semesta ini dalam suatu keteraturan hingga dari lisan terpercik berjuta rasa syukur kehadiran Allah swt karena atas limpahan Rahmat, Hidayah dan Karunia-Nyalah sehingga saya diberikan kekuatan, kesempatan dan kemudahan kepada hamba-Nya untuk menyelesaikan tugas akhir (skripsi) ini yang berjudul **“Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Enzim Fitase asal Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Berbasis Gen 16S rRNA”** dapat diselesaikan dengan baik sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. Shalawat dan Salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Baginda Besar Nabi Muhammad saw, kepada keluarganya, para sahabatnya, hingga pada umatnya hingga akhir zaman ini yang diutus ke permukaan bumi ini untuk menuntun manusia dari alam kegelapan menuju ke alam yang terang seperti yang dirasakan saat ini.

Penulis juga tidak lupa mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua penulis, Ayahanda Guntoyo dan Ibunda Ruwet Hartini atas dukungan moril maupun materil yang telah diberikan kepada penulis dengan sepenuh hati selama ini demi keberhasilan penulis, serta keluarga besarku yang tiada henti-hentinya memberikan do'a, semangat, motivasi, dan nasehat-nasehat dengan penuh keikhlasan, kesabaran serta kasih sayang.

Penulis menyadari sepenuhnya, dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari hambatan dan tantangan. Namun berkat kerja keras dan motivasi dari pihak-pihak langsung maupun tidak langsung yang memperlancar jalannya penyusunan skripsi ini. Olehnya itu, secara mendalam saya menyampaikan banyak terima kasih kepada semua yang membantu dalam penyelesaian skripsi ini diantaranya :

1. Prof. Dr. H. Musafir Pababbari, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar serta sejarannya.
2. Prof. Dr. H. Arifuddin Ahmad, M.Ag., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar dan sejarannya.
3. Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes., selaku Ketua Jurusan Biologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
4. Baiq Farhatul Wahidah, S.Si., M.Si., selaku Sekretaris Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
5. Hafsan, S.Si., M.Pd sebagai Dosen Pembimbing I dan Isna Rasdiana Aziz S.Si., M.Sc selaku Dosen Pembimbing II yang sabar memberikan bimbingan, arahan, masukan, dan telah meluangkan waktu membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Prof. Dr. H. Arifuddin Ahmad, M.Ag., Dr. Cut Muthiadin, S.Si., M.Si. dan Ar. Syarif Hidayat, S.Si., M.Kes., selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan masukan yang sangat bermanfaat bagi penelitian dan penulisan skripsi penulis.
7. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Pengajar yang selama ini telah mengajarkan banyak hal serta pengetahuan yang berlimpah selama kuliah di kampus ini serta seluruh Staf Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
8. Kepada seluruh Laboran Laboratorium Jurusan Biologi FST UIN Alauddin Makassar yang memberikan ilmu, arahan, dan membantu selama penelitian ini.
9. Kepala perpustakaan beserta jajarannya, terima kasih atas bantuannya selama ini.

10. Teman-teman anggota research FITASE TEAM (yang selama ini selalu menemani dan menyemangati penulis dalam melakukan penelitian hingga menyusun skripsi.
11. Sahabat-sahabatku Hikmah, Husnul, Ety yang selalu bersama dalam suka dan duka selama masa perkuliahan serta senantiasa memberikan dukungan dan solusi dalam penyelesaian masalah-masalah yang dihadapi selama penelitian dan penyusunan skripsi.
12. Terimakasih kepada teman-teman angkatan 2013 “BRACHIALIS” yang telah memberikan dukungan dan motivasi, suka dan duka hidup sebagai mahasiswa kita rasakan bersama serta banyak kenangan yang tak terlupakan selama ini.
13. Teman-teman KKN Desa Lassa-Lassa Kecamatan Bontolempangan (Shawir, Rika, Miming, Ina, Dewi dan Mansyur) yang merupakan keluarga saya yang selalu memberi semangat penulis dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.
14. Adik-adik angkatan 2014, 2015 dan 2016 terima kasih atas dukungan dan doanya selama ini.
15. Serta seluruh pihak terkait yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas doa, semangat, dukungan, saran dan pemikiran yang diberikan kepada penulis.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati saya menyadari bahwa hanya kepada Allah swt jualah saya menyerahkan segalanya. Semoga apa yang diharapkan dan dicita-citakan dapat tercapai atas kehendakNya. Aamiin ya Robbal Alamin...

Samata-Gowa, Rabu 26 Juli 2017
Penulis

Yuniar Harvianti
NIM: 60300113045

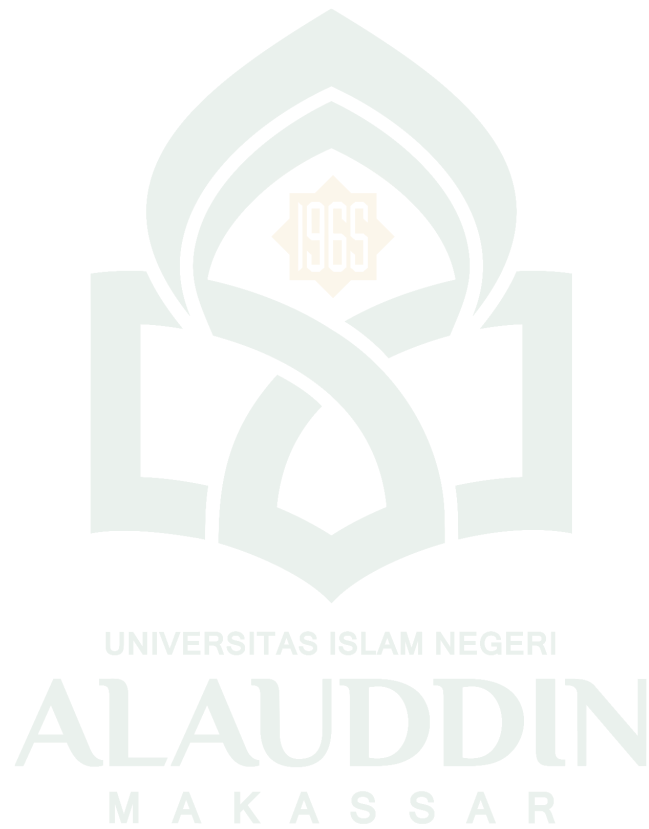
DAFTAR ISI

JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PERSETUJUAN PEMBIMBING	iv
KATA PENGANTAR	v-vii
DAFTAR ISI	viii-ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1-11
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Ruang Lingkup Penelitian.....	7
D. Kajian Pustaka.....	8
E. Tujuan Penelitian	10
F. Kegunaan Penelitian.....	10
BAB II TINJAUAN TEORITIS	12-41
A. Ayat al-Qur'an yang Relevan.....	12
B. Tinjauan Tentang Asosiasi Tanaman Jagung (<i>Zea mays</i> L.) Dengan Bakteri Endofit.....	15
C. Tinjauan Tentang Asam Fitat.....	17
D. Tinjauan Tentang Fitase.....	18
E. Tinjauan Tentang DNA.....	19
F. Tinjauan Tentang Replikasi DNA.....	20
G. Tinjauan Tentang Identifikasi Molekuler Melalui Amplifikasi Gen 16S-rRNA	22
H. Tentang PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	27
I. Tinjauan Tentang Elektroforesis Gel Agarosa.....	31
J. Tinjauan Tentang Sekuensing.....	33
K. Tinjauan Tentang Pohon Filogenetika	36
L. Kerangka Pikir	41

BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	42-48
	A. Jenis dan Lokasi Penelitian	42
	B. Pendekatan Penelitian	42
	C. Variabel Penelitian	42
	D. Definisi Operasional Variabel	42
	E. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)	43
	F. Prosedur Kerja	44
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	49-75
	A. Hasil Penelitian	49
	B. Pembahasan	57
BAB V	PENUTUP	76-77
	A. Kesimpulan	76
	B. Saran	77
	DAFTAR PUSTAKA	79-86
	LAMPIRAN-LAMPIRAN	87-96
	DAFTAR RIWAYAT HIDUP	97

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Komposisi PCR Mix	46
------------------------------------	----



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Asam Fitat	17
Gambar 2.2. Struktur ribosom pada prokariot	23
Gambar 2.3. Ilustrasi amplifikasi PCR	31
Gambar 3.1 Siklus PCR	47
Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis dari produk Amplifikasi gen 16S-rRNA	50
Gambar 4.2. Urutan basa nukleotida keempat isolat bakteri terpilih hasil sekuensing	51
Gambar 4.3. Hasil analisis BLAST isolat-isolat Bakteri	53
Gambar 4.4. Perbandingan urutan nukleotida isolat HF 1 (<i>Query</i>) dengan bakteri <i>Burkholderia lata</i> strain 383 (<i>Subject</i>)	55
Gambar 4.5. Perbandingan urutan nukleotida isolat HF 2 (<i>Query</i>) dengan bakteri <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> Strain ATCC 23373 (<i>Subject</i>)	55
Gambar 4.6. Perbandingan urutan nukleotida isolat HF 3 (<i>Query</i>) dengan bakteri <i>Enterobacter ludwigii</i> strain EN-119 (<i>Subject</i>)	56
Gambar 4.7. Perbandingan urutan nukleotida isolat HF 32 (<i>Query</i>) dengan bakteri <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i> strain CIP 104006 (<i>Subject</i>)	56
Gambar 4.8. Pohon filogenetik kelompok isolat bakteri penghasil fitase menggunakan metode <i>neighbor-joining</i> berdasarkan hasil analisis 16S-rRNA	57

ABSTRAK

Nama : Yuniar Harvianti
NIM : 60300113045
Judul Skripsi : “Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Enzim
Fitase asal Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Berbasis Gen 16S
rRNA”

Asam fitat merupakan bentuk utama penyimpanan fosfat di dalam bahan makanan yang tidak dapat dihidrolisis dalam saluran pencernaan hewan monogastrik, yang berasosiasi dengan protein dan garam mineral membentuk senyawa kompleks yang tidak larut sehingga menghambat penyerapan fosfat, protein dan mineral di dalam tubuh. Asam fitat dapat dihidrolisis dengan bantuan enzim fitase. Enzim fitase mempunyai peran penting dalam ketersediaan nutrisi pada bahan pangan. Bakteri merupakan salah satu sumber penghasil fitase yang potensial sehingga perlu dilakukan penggalian galur bakteri penghasil fitase dari lingkungan sekitar salah satunya dari tanaman jagung (*Zea mays* L.). Bakteri endofit penghasil fitase telah berhasil diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) dan diidentifikasi secara fenotipik dan biokimiawi. Untuk memperkuat data identifikasi fenotipik dan biokimiawi maka dilakukanlah analisis secara molekuler berbasis Gen 16S rRNA. Setelah diidentifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa isolat HF 1 memiliki kesamaan 99% dengan *Burkholderia lata*, isolat HF 2 memiliki kesamaan 99% dengan *Enterobacter cloacae*, isolat HF 3 memiliki kesamaan 98% dengan *Enterobacter ludwigii* dan isolat HF 4 memiliki kesamaan 97% dengan *Pantoea stewartii subsp. indologenes*. Berdasarkan analisis filogenetik isolat HF 1 paling dekat dengan *Burkholderia lata* strain 383 dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai bootstrap 100, isolat HF 2 paling dekat dengan *Enterobacter cloacae* dengan jarak genetik 0,02 (dekat) dan nilai Bootstrap 86, isolat HF 3 paling dekat dengan *Enterobacter ludwigii* dengan jarak genetik 0,02 (dekat) dan nilai bootstrap 87, isolat HF 4 memiliki kedekatan dengan *Pantoea stewartii subsp. indologenes* dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai bootstrap 99

Kata kunci: Asam Fitat, Fitase, Gen 16S rRNA, Bakteri Endofit, *Zea mays* L., Analisis filogenetik, *Burkholderia lata*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Pantoea stewartii subsp. indologenes*

ABSTRACT

Name : Yuniar Harvianti

SIN : 60300113045

Minithesis Title : “Molecular Identification of Bacteria Endophytic Producing Enzyme Phytase from Corn (*Zea Mays* L.) Based On 16S rRNA Gene”

Phytic acid is the basic storage form of phosphate saving in the feed that can not be hydrolyzed in the gastrointestinal tract, which are associated with protein and its salt make an insoluble complex compounds that inhibit the absorption of protein and minerals in the body. Phytic acid can be hydrolyzed by phytase. Enzyme Phytase has enzyme important role in feed nutrition availability. Bacteria is one of potential source of phytase, so more excavation for phytase-producing strains of bacteria from the environment one of it from corn plant (*Zea mays* L.). Endophytic bacteria phytase-producing from the corn plant (*Zea mays* L.) has been isolated and has been identified phenotypically and biochemically. Four isolates that have the highest phytatic index will be analysed by molecular using 16S-rRNA gene. The results showed that isolate from HF 1 has 99% similarity with *Burkholderia lata*, Isolat HF 2 has 99% similarity with *Enterobacter cloacae*, isolate HF 3 has 98% similarity with *Enterobacter ludwigii* and isolate HF 4 has 97% similarity with *Pantoea stewartii*. Based on Phylogenetic analysis the closest of isolate HF 1 is *Burkholderia lata* with genetic distance is 0,01 and bootstrap value is 100, isolate HF 2 is the closest by *Enterobacter cloacae* with genetic distance is 0,02 and bootstrap value is 86, isolate HF 3 is the closest by *Enterobacter ludwigii* with genetic distance is 0,02 and bootstrap value is 87 and then isolate HF 4 is the closest by *Pantoea stewartii subsp. indologenes* with genetic distance is 0,01 and bootstrap value is 99.

Keywords: Phytic acid, Phytase, 16S rRNA gene, Bacteria endophytic, *Zea mays* L., Phylogenetic analysis, *Burkholderia lata*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Pantoea stewartii subsp. indologenes*

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Alam ini sesungguhnya adalah laboratorium yang besar yang digelar Allah swt. untuk penelitian, berupa tafakur mengenal sunatullah yaitu tentang fenomena alam. Yang dapat kita contohkan bahwa sebelum ilmuwan memulai suatu proyek baru, mereka biasanya mencari model pada makhluk hidup, dan meniru sistem dan desain makhluk hidup tersebut. Dengan kata lain, ilmuwan mengamati dan mempelajari rancangan-rancangan yang diciptakan oleh Allah swt. di alam, setelah terilhami olehNya, mereka pun lalu mengembangkan teknologi baru. Manusia disuruh mengamati alam sekitar, agar pengamatan tersebut menjadikan kita semakin mengenal Maha Besar Allah swt. dan semakin menyadari bahwa kita sangat membutuhkan Allah swt. Sebagaimana yang difirmankan Allah pada Q.S. An-nahl/16: 13 yang berbunyi:

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَنُهُ ۖ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ
يَذْكُرُونَ ﴿١٣﴾

Terjemahnya:

dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran. (Kementerian Agama RI, 2012).

Dalam Tafsir al-Mishbah (2002) dijelaskan bahwa *Dan*, selain aneka anugerah yang disebut sebelum ini, Allah swt. juga menundukkan *apa yang Dia kembangkan untuk kamu di bumi* seperti aneka binatang, *dengan berlain-lainan warna jenis, bentuk dan cirinya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda yang jelas lagi agung yang menunjukkan kekuasaan Allah bagi kaum yang merenung dan ingin mengambil pelajaran.*

Fakharuddin ar-Razi mengemukakan pendapat yaitu menurutnya diakibatkan oleh kebutuhan akan sulit atau mudahnya, serius dan santainya, objek pengamatan. Pengamatan menyangkut makhluk yang bersumber dari bumi memerlukan pemikiran, yaitu penggunaan nalar yang menghasilkan ilmu, sedang pengamatan terhadap objek-objek yang bersumber dari pengembangbiakan dan yang beraneka macam warna dan jenisnya itu memerlukan pengamatan lebih serius dari objek yang lalu karena ia berkaitan dengan keanekaragaman keadaan, pengembangbiakan dan manfaat-manfaatnya sehingga di sini yang diperlukan adalah *tadzakkur* yakni pemikiran yang disertai ingatan tentang jenis, perbedaan dan ciri-ciri masing-masing.

Kata “*berbagai jenis*” dalam al-Qur’an surat An-nahl ayat 13 menyatakan bahwa Allah swt. telah menciptakan makhluk hidup di bumi ini dengan berbagai bentuk, baik mikroskopis maupun makroskopis. Bakteri termasuk makhluk hidup yang memiliki ukuran mikroskopis. Seperti yang dijelaskan dalam tafsir Al-Mishbah bahwa setiap makhluk hidup yang diciptakan Allah swt. memiliki manfaat dan

kegunaan masing-masing termasuk bakteri penghasil fitase yang dapat memecah asam fitat sebagai komponen antinutrisi dalam pencernaan hewan monogastrik.

Asam fitat adalah bentuk utama simpanan fosfat pada tanaman, merupakan sumber inositol dan fosfat dalam biji tumbuhan. Asam fitat terutama terdapat pada tanaman golongan serelia, biji-bijian dan polong-polongan, antara lain pada tanaman jagung, gandum, kedelai kacang tanah, padi dan biji bunga matahari (Wulandari, 2011).

Asam fitat dapat menjadi sebuah komponen antinutrisi karena kemampuannya mengikat protein dan ion mineral seperti kalsium, besi, seng, magnesium, mangan dan copper (Chu *et al*, 2000 dalam Wulandari, 2011). Ikatan yang kuat akan menurunkan kelarutan, daya cerna dan penyerapan protein serta mineral (Ca, Fe, Zn dan Mg). Kekurangan mineral di dalam tubuh dapat menyebabkan gangguan metabolisme yang dapat menyebabkan gangguan berbagai penyakit. Kompleks asam fitat bersama dengan protein enzim pencernaan menyebabkan penurunan aktivitas enzim pencernaan (Sari, 2012). Pada saluran pencernaan ternak non ruminansia tidak terdapat enzim fitase, hal ini menyebabkan kandungan senyawa fitat dalam biji sukar dicerna karena kuatnya sifat chelating, sehingga fitat terbuang bersama kotoran (Haryadi, 2007)

Asam fitat tidak dapat dihidrolisis dan tidak dapat dicerna di dalam saluran pencernaan sehingga akan diekskresikan melalui kotoran. Kotoran-kotoran yang mengandung gugus fosfat tersebut dapat mencemari tanah dan perairan di sekitarnya (Sari, 2012). Pencemaran tanah, air, sungai dan juga danau dapat mengakibatkan

penyuburan perairan yang berlebihan yang akan menyuburkan alga beracun dan mengganggu ekosistem perairan. Untuk menanggulangi masalah pencemaran tersebut, biasanya pada pakan ternak ditambahkan dengan enzim fitase (Wulandari, 2011).

Fitase atau *mio-inositol heksakisfosfat* adalah enzim yang mengkatalis reaksi ikatan fosfodiester pada asam fitat (*mio-inositol heksakisfosfat*), menghasilkan fosfat anorganik dan ester-ester fosfat dari mio inositol yang lebih rendah. Fitase dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan, mikroorganisme (bakteri, jamur, *yeast*) dan jaringan tubuh ternak (Wulandari, 2011). Fitase dari mikroorganisme yang telah diteliti oleh para ahli antara lain: fitase dari *Aspergillus niger* (Nagashima, 1999), *Aspergillus ficuum* (Irving *et al.*, 1972), *Bacillus subtilis* (Kerouvo *et al.*, 2000), *Escherichia coli* (Greiner *et al.*, 1972), dan *Klebsiella pneumonia* (Sajidan *et al.*, 2004).

Salah satu alternatif sumber fitase yang dapat dimanfaatkan untuk memecah fitat adalah yang berasal dari mikroorganisme dan fitase merupakan suatu enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme (Haryadi, 2007). Penambahan fitase pada pakan ternak dapat meningkatkan ketersediaan fosfat, kalsium dan protein pada ternak. Beberapa penelitian tentang penggunaan fitase dalam bentuk probiotik pada ternak telah dilakukan dengan penggunaan bakteri penghasil fitase sebagai campuran *wheat pollard* pakan ternak unggas. Diketahui campuran probiotik tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan ayam (Sajidan *et al.*, 2004).

Indonesia sebagai Negara tropis mempunyai potensi keanekaragaman bakteri yang tinggi termasuk bakteri penghasil enzim fitase. Indonesia adalah Negara yang

sangat kaya dengan plasma nutfah termasuk mikroorganisme yang ada di dalamnya sehingga mampu menyediakan isolat-isolat mikroba yang memiliki manfaat dan nilai ekonomis yang tinggi. Pencarian isolat-isolat mikroba secara umum bertujuan mencari mikroba penghasil metabolit yang dapat bermanfaat bagi manusia misalnya antibiotik, enzim dan senyawa antitumor lainnya (Natsir *et al.*, 1999).

Kelimpahan mikroorganisme di alam membuat seorang saintis harus mengetahui spesies mikroorganisme tertentu, sehingga dengan begitu akan memudahkan dalam mempelajarinya. Perkembangan ilmu dan pengetahuan dalam biologi molekuler, khususnya pada pengkajian karakter bahan genetik telah menghasilkan kemajuan yang sangat pesat bagi perkembangan penelaahan suatu organisme dan pemanfaatannya bagi kesejahteraan manusia (Irawan, 2008).

Bakteri sebagai salah satu penghasil enzim yang potensial menjadi faktor penting dalam produksi enzim (Hadietomo, 1993). Oleh karena itu diperlukan usaha penggalian galur-galur bakteri penghasil fitase dari alam sekitar, salah satunya dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) dengan varietas tertentu. Isolat bakteri endofit penghasil fitase yang diisolasi dari akar, batang, daun dan biji serta masing-masing isolat tersebut diseleksi dan dipilih berdasarkan indeks fitatik tertinggi yang selanjutnya diidentifikasi secara fenotipik.

Proses identifikasi bakteri penghasil enzim fitase dapat dilakukan berdasarkan sifat fenotipik yang didasarkan pada hasil pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis (pewarnaan gram), uji fisiologis atau metabolik (biokimia). Namun demikian, identifikasi bakteri berdasarkan karakter fenotip maupun biokimia telah

diketahui memiliki kelemahan, yaitu kerap terjadi perbedaan dalam pembacaan hasil identifikasi. Selain itu karakter fenotip yang sama belum tentu menunjukkan bakteri yang sama juga. Begitu juga karakter biokimia yang merupakan karakter yang dapat berubah oleh adanya stress akibat pengaruh lingkungan (tidak statis) sehingga dapat menyebabkan evolusi. Kelemahan metode fenotipik terkait tingkat reproduisibilitasnya, dimana metode tersebut memberikan hasil yang berbeda-beda apabila diulang, sehingga dianggap kurang handal (*reliable*). Selain itu, metode ini juga mengkarakterisasi organisme berdasarkan produk ekspresi gen yang sangat sensitif terhadap berbagai macam kondisi lingkungan seperti suhu pertumbuhan, fase pertumbuhan dan mutasi spontan. Kelemahan metode fenotipik ini menjadi dasar pengembangan metode genotipik berbasis DNA. Sehingga, metode genotipik berbasis DNA menjadi lebih populer dan diterima secara luas karena bersifat reproduibel, praktis, menunjukkan perbedaan antar spesies yang lebih kontras serta dapat membantu menghindari duplikasi strain. Selain itu, analisis molekuler diperuntukkan untuk memperkuat dan mendukung identifikasi secara fenotipik. Hal tersebut dikarenakan karakter molekuler lebih stabil terhadap pengaruh lingkungan (Yuwono, 2006).

Adanya kelemahan identifikasi isolat bakteri penghasil enzim fitase asal tanaman jagung (*Zea mays* L.) melalui analisa fenotipik mendorong dilakukannya identifikasi dengan metode lain yang lebih akurat yaitu analisa secara genotipik. Metode identifikasi bakteri yang banyak direkomendasikan adalah analisa gentotip dengan menggunakan metode molekuler antara lain melalui sekuensing gen pengkode

16S rRNA dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Penggunaan Gen 16S rRNA paling sering digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, karena panjang basanya ideal yaitu 1540 nukleotida sehingga informasi genetik yang dimilikinya cukup banyak dan lebih mudah diolah (Madigan et al., 1997 dalam Arham, 2015). Selain untuk mengidentifikasi spesies bakteri, metode molekuler dengan gen pengkode 16S rRNA telah terbukti sangat berguna dan akurat dalam menentukan hubungan kekerabatan bakteri dalam pohon filogenetik (Liu *et al.*, 1997). Selain lebih akurat, identifikasi secara molekuler juga dinilai lebih cepat (Suyanto, 2003).

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Jenis bakteri endofit apakah sebagai penghasil enzim fitase dari tanaman jagung (*Zea mays* L.)?
2. Bagaimana hubungan isolat-isolat bakteri penghasil fitase dengan bakteri yang teridentifikasi mirip dengan isolat-isolat bakteri penghasil fitase dalam pohon filogenik?

C. Ruang Lingkup Penelitian

Adapun ruang lingkup pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel bakteri endofit penghasil fitase diperoleh dari hasil isolasi bakteri endofit penghasil fitase dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) yang telah dimurnikan. Isolat yang terpilih adalah isolat bakteri endofit dari akar, batang,

daun dan biji yang memiliki indeks fitatik tertinggi yang ditandai dengan adanya zona bening (halo).

2. Kode isolat HF 1 merupakan isolat bakteri dari Akar 10^{-7} KL.7, kode isolat HF 2 merupakan isolat bakteri dari Biji 10^{-8} KL.1, kode isolat HF 3 merupakan isolat bakteri dari Daun 10^{-6} KL.3 dan kode isolat HF 4 merupakan isolat bakteri dari Batang 10^{-7} KL.7.
3. Identifikasi molekuler adalah metode yang dilakukan untuk mengetahui secara pasti spesies bakteri penghasil fitase dan hubungan filogenetik antar spesies bakteri penghasil fitase yang terdapat pada tanaman jagung (*Zea mays* L.) Berdasarkan hasil amplifikasi Gen 16S rRNA menggunakan PCR yang selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida. Data nukleotida tersebut dimasukkan dalam program BLAST untuk dicocokkan dengan data spesies pada Gen Bank. Dalam proses penentuan hubungan filogenetik dilakukan dengan menggunakan program Clustal W. Selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik.

D. Kajian Pustaka

Dalam kajian pustaka dibahas beberapa temuan hasil penelitian sebelumnya untuk melihat kejelasan arah, originalitas dan posisi dari penelitian ini, dibandingkan dengan beberapa temuan penelitian yang dilakukan sebelumnya yaitu sebagai berikut:

1. Penelitian Sari (2012) menunjukkan bahwa terdapat 3 bakteri isolat air Kawah Sikidang Dieng yang memiliki aktivitas fitase tertinggi yaitu *Bacillus* sp. EN 6, *Bacillus cereus* EN 10, dan *Bacillus cereus* EN 16.
2. Sajidan *et al.*, (2015) telah melakukan penelitian dengan mengisolasi bakteri penghasil fitase dari abu vulkanik yang diambil dari Selo di sisi utara Gunung Merapi di Jawa Tengah, dan dari Cangkringan Yogyakarta di sisi selatan gunung serta melakukan identifikasi molekuler berbasis 16 rRNA terhadap isolat terpilih dan memperoleh hasil dari enam isolat (MS5 , MC6 , MC8 , D6 , D10 dan D16) menunjukkan kesamaan yang tinggi mengacu pada genus *Bacillus*. Isolat MS5, MC6 , D10 dan D16 menunjukkan 99 % sama dengan *B. cereus*, sedangkan isolat MC8 menunjukkan 99% sama dengan *B. aryabhatti* dan D6 99 % sama dengan *B. Psychrotolerans*.
3. S., Sreedevi dan Reddy B.N (2013) telah melakukan penelitian dengan menggunakan sampel tanah yang diambil dari sekitar kandang peternakan unggas di berbagai daerah dan mengidentifikasi isolat terpilih C43 berdasarkan analisis gen 16S rRNA. Isolat C43 menunjukkan kesamaan yang tinggi untuk *Bacillus subtilis* sp. spizizenii strain 3EC5A1.
4. Wulandari (2011) telah berhasil melakukan penelitian dengan mengisolasi bakteri penghasil fitase dari abu vulkanik gunung merapi dan memperoleh 3 isolat dengan aktivitas fitase terbesar dan menganalisisnya dengan analisis gen 16S rRNA dan memperoleh hasil bahwa spesies ketiga isolat tersebut adalah

kelompok *Bacillus*, masing-masing adalah *Bacillus cereus* RW Sm A, *Bacillus aryabhattai* RW Sm C dan *Bacillus cereus* RW SI 5.

5. Penelitian Lazado *et al.* (2010), menemukan 2 jenis bakteri dari 216 bakteri yang berasal secara alami dari saluran usus ikan Atlantic Cod memberikan hasil positif untuk aktivitas fitase. Kedua bakteri tersebut diidentifikasi sebagai Strain bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Psychrobacter* sp. karena mereka memiliki homologi paling dekat dengan *Pseudomonas cf synxantha* dan *Psychrobacter glacincola* berdasarkan 16S rRNA.

E. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui jenis bakteri endofit penghasil enzim fitase dari tanaman jagung (*Zea mays* L.).
2. Untuk mengetahui hubungan isolat-isolat bakteri penghasil fitase dengan bakteri yang teridentifikasi mirip dengan isolat-isolat bakteri penghasil fitase dalam pohon filogenik

F. Kegunaan Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam bidang mikrobiologi mengenai spesies bakteri penghasil fitase yang telah berhasil diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) dengan varietas tertentu.

2. Mengetahui keanekaragaman bakteri penghasil fitase yang diisolasi dari setiap organ tanaman (akar, batang, daun dan biji) dari satu varietas jagung (*Zea mays* L.).
3. Memberi sumbangan untuk pengetahuan terhadap biodiversitas mikroorganisme lokal di Indonesia dengan mengetahui jenis spesies setiap bakteri.



BAB II

TINJAUAN TEORITIS

A. Ayat al-Qur'an yang Relevan

Adanya berbagai jenis makhluk hidup yang diciptakan Allah di alam semesta ini merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah. Allah swt. menciptakan berbagai jenis makhluk-makhluknya dengan perbedaan-perbedaan yang jelas, dari yang dapat diamati hingga perbedaan-perbedaan yang paling spesifik, hal tersebut telah dijelaskan oleh Allah swt. dalam QS. Fathir/35: 28 yang berbunyi:

وَمِنَ النَّاسِ وَالْدَّوَابِّ وَالْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ، كَذَلِكَ إِنَّمَا تَخْشَى
اللَّهُ مِنْ عِبَادِهِ الَّذِينَ عَلِمُوا أَنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ ﴿٢٨﴾

Terjemahnya:

dan demikian (pula) di antara manusia, binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang bermacam-macam warnanya (dan jenisnya). Sesungguhnya yang takut kepada Allah di antara hamba-hamba-Nya, hanyalah ulama. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Pengampun (Kementerian Agama RI, 2012).

Tafsir al-mishbah (2002) juga menjelaskan QS. Fathir ayat 28 dimana pada ayat sebelumnya (QS. Fathir ayat 27) memaparkan tentang berbagai jenis buah-buahan dan perbedaan warna gunung-gunung, ayat ini pun menyitir perbedaan bentuk dan warna makhluk hidup. Ayat diatas menyatakan: *dan demikian (pula) di antara manusia, binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang*

bermacam-macam bentuk, ukuran, jenis dan *warnanya seperti itu* pula. Sebagian dari penyebab perbedaan itu dapat ditangkap oleh ilmuwan dan karena itu *Sesungguhnya yang takut kepada Allah di antara hamba-hamba-Nya, hanyalah ulama. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Pengampun.*

Firman-Nya “*Mukhtalifun alwaanuh*” dipahami oleh banyak ulama dalam arti seperti keragaman itu juga terjadi pada makhluk-makhluk hidup itu. Ada juga ulama yang memahaminya dalam arti “seperti itulah perbedaan-perbedaan yang tampak dalam kenyataan yang dialami makhluk”.

Ayat ini menggarisbawahi juga kesatuan sumber materi namun menghasilkan aneka perbedaan. Sperma yang menjadi bahan dasar penciptaan dan cikal bakal manusia dan binatang, pada hakikatnya tampak tidak berbeda dalam kenyataannya satu dengan yang lainnya. Di sinilah letak salah satu misteri gen dan plasma. Ayat ini pun mengisyaratkan bahwa faktor genetislah yang menjadikan tumbuh-tumbuhan, hewan dan manusia tetap memiliki ciri khasnya dan tidak berubah hanya disebabkan oleh habitat dan makanannya. Maka sungguh jika ayat ini menyatakan bahwa para ilmuwan yang mengetahui rahasia-rahasia penciptaan sebagai kelompok manusia yang paling takut kepada Allah.

ayat diatas menjelaskan bahwa Allah menciptakan semua jenis makhluk hidup di bumi dengan keanekaragaman. Dimana keanekaragaman di bumi terjadi berdasarkan kehendak Allah swt.. Hal tersebut telah dijelaskan dalam ayat sebelumnya yaitu pada QS. Fathir pada ayat 27 bahwa perbedaan tersebut bukan terjadi secara alamiah melainkan semua ada sebabnya. Dan sebabnya telah dipertegas

dalam QS. Fathir ayat 28 dimana hal tersebut dapat terjadi karena faktor genetis. Faktor genetis tersebut akan mempengaruhi kenakeragaman yang terjadi di bumi, baik keanekaragaman manusia, binatang, tumbuhan dan makhluk hidup yang berukuran mikro (mikroskopis). Setiap makhluk hidup memiliki susunan gen-gen yang berbeda, begitu pula mikroba yang memiliki susunan gen-gen yang berbeda sehingga akan melahirkan mikroba yang beranekaragam spesiesnya, termasuk bakteri penghasil fitase.

Masalah tentang genetika juga dijelaskan lebih jelas dalam QS. Al-Infitaar/82: 8 yang berbunyi:

فِي أَيِّ صُورَةٍ مَّا شَاءَ رَكَّبَكَ

Terjemahnya:

dalam bentuk apa saja yang Dia kehendaki, Dia menyusun tubuhmu (Kementerian Agama RI, 2012).

Mujahid mengatakan bahwa makna yang dimaksud adalah mirip dengan ayah atau ibu atau paman dari pihak ayah menurut apa yang dikhendaki. Dalam tafsir al-Misbah (2002) menjelaskan jika Dia mengkhendaki bisa saja Dia menjadikan dalam bentuk berupa anjing, atau berupa kedelai atau berupa babi. Allah swt. berkuasa untuk menciptakan nutfah menjadi manusia yang buruk rupanya menjijikkan, tetapi berkat kekuasaan-Nya dan kasih sayang-Nya kepada Makhluk-Nya, Dia menciptakan manusia dalam bentuk yang baik, tegak, sempurna dan indah penampilanya serta rupanya.

Kata “Dia menyusun tubuhmu” dapat dikatakan bahwa Allah swt. menyusun tubuh makhluk hidup mulai dari yang bagian terkecil hingga bagian yang terbesar. Bagian terkecil penyusun tubuh makhluk hidup adalah materi genetik yang termasuk adalah DNA. Bukan hanya manusia yang memiliki DNA, tetapi bakteri memiliki DNA pula. Sehingga materi genetik yang berupa DNA dapat dijadikan sebagai acuan untuk menentukan suatu spesies bakteri.

B. Tinjauan Teori Tentang Asosiasi Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Dengan Bakteri Endofit

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan salah satu komoditas palawijaya utama di Indonesia ditinjau dari aspek pengusahaan dan penggunaan hasilnya, yaitu sebagai bahan baku pangan dan pakan. Kebutuhan jagung terus meningkat seiring dengan meningkatnya permintaan bahan baku pakan. Komposisi bahan baku pakan ternak unggas membutuhkan jagung sekitar 50% dari bahan total yang diperlukan (Sarusutha, 2002).

Kebanyakan sumber pangan berasal dari sereal dan biji-bijian termasuk jagung mempunyai kandungan fitat yang tersimpan dalam biji yaitu pada aleuron dan pada titik germinasi yang merupakan tempat penyimpanan utama mineral dalam tanaman. Di dalam jagung, asam fitat berperan dalam proses dormansi dan perkecambahan biji tanaman. Asam fitat juga merupakan antioksidan dan agen anti kanker. Namun pada manusia dan hewan, asam fitat dapat menjadi komponen antinutrisi. Asam fitat sangat potensial mengikat nitrogen, asam amino dan mineral

pada makanan. Ikatan tersebut merupakan kompleks yang tidak larut sehingga sulit dihidrolisis dalam pencernaan, sukar diserap dan mempengaruhi ketersediaan nutrisi.

Di dalam jagung terdapat asam fitat yang memungkinkan terdapat bakteri yang dapat mendegradasi asam fitat dengan bantuan enzim fitase. Bakteri yang terdapat dalam tanaman disebut bakteri endofit. Mikroorganisme endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme yang selama siklus hidupnya berada dalam jaringan tanaman dan dapat membentuk koloni tanpa menimbulkan kerusakan pada tanaman tersebut. Hubungan antara mikroba endofit dan tumbuhan inangnya merupakan suatu bentuk hubungan simbiosis mutualisme yaitu sebuah bentuk hubungan yang saling menguntungkan. (Kurnia *et al.*, 2014). Mikroorganisme endofit tersebut merupakan mikroorganisme yang dapat diekstrak dari bagian dalam tanaman atau diisolasi dari permukaan jaringan tanaman. Bakteri endofit dan fungi berfilamen pernah diisolasi dari biji akar, batang dan ranting serta kulit kayu dari berbagai macam jenis tanaman.

Dari sekitar 3000.000 jenis tanaman yang tersebar di permukaan bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroorganisme endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Radji, 2005). Sehingga mikroorganisme endofit dapat menjadi sumber berbagai metabolit sekunder baru yang berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang medis, pertanian dan industri termasuk industri pakan ternak atau produksi lain yang dimana bahan baku utamanya mengandung asam fitat yang tinggi.

C. Tinjauan Tentang Asam Fitat

Asam fitat atau *myo-inositol hexakisphosphate* merupakan bentuk utama penyimpanan unsur fosfat yang terdapat pada tanaman biji-bijian, sereal, leguminose dan oilseed (Kerovuo *et al.*, 2000 dalam Sari, 2012). Asam fitat secara struktural adalah suatu cincin myo inositol yang mengikat penuh 6 fosfat disekeliling cincin. Rantai C dikelilingi oleh 6 atom fosfat yang berikatan dengan oksigen dan hidrogen.



Gambar 2.1 struktur asam fitat (Sumber: Graf, 1983 dalam Wulandari, 2011)

Kandungan asam fitat sangat banyak terdapat dalam tumbuhan, sel mikroorganisme dan ternak. Biji-bijian tumbuhan mengandung 60-90% fosfor terikat fitat dalam bentuk garam asam fitat. Asam fitat terdapat pada tanaman pangan seperti jagung, gandum, kedelai, kacang tanah, padi dan juga terkandung dalam bunga matahari. Asam fitat memiliki peran dalam proses dormansi tanaman dan perkecambahan biji sebagai sumber ATP, berperan pada fungsi biologis penyimpanan fosfor dan kation yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bibit tanaman. Kebanyakan tanaman yang mengandung asam fitat tersebut merupakan sumber pangan pada ternak maupun manusia (Wulandari, 2011).

Dilihat dari sudut pandang tanaman, fitat penting untuk pertumbuhan biji dan turut berperan dalam meningkatkan hasil panen. Namun jika dilihat dari sudut pandang hewan dan manusia, fitat merupakan komponen anti nutrisi (Thompson, 1993 dalam Sari, 2012). Adanya asam fitat menyebabkan beberapa mineral dan protein menjadi tidak terlarut sehingga tidak dapat diserap oleh usus manusia dan hewan monogastrik (Liu *et al.*, 2005 dalam Sari, 2012).

D. Tinjauan Tentang Fitase

Fitase atau *myo-inositol hexakiphosphate phosphohydrolase* (EC.3. 1.3.8) pertama kali ditemukan oleh Suzuki (1907) dalam penelitiannya tentang hidrolisis bekatul. Fitase merupakan enzim fosfatase yang mampu mengkatalis hidrolisis pelepasan fosfat pada fitat. Hidrolisis asam fitat sangat bermanfaat untuk meningkatkan nutrisi pada beberapa tanaman pangan.

Fitase pada umumnya digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan ternak untuk meningkatkan kualitas nutrisi bahan pangan dan produk pakan yang mengandung fosfat dengan cara mereduksi asam fitat. Menurut Yao *et al.*, (2011) asam fitat memiliki ikatan yang kompleks dengan pati, protein dan mineral lain yang tidak mudah larut sehingga tidak dapat diserap oleh usus. Adanya penambahan fitase akan menghidrolisis asam fitat menjadi 1 molekul inositol, 6 molekul fosfat anorganik, ion Ca^{2+} , Zn^{2+} dan protein sehingga fosfat dan mineral yang terikat dapat dilepaskan dan dimanfaatkan oleh tubuh. Lain halnya dengan Kusumadjaja *et al.*,

(2009) yang menyatakan bahwa hidrolisis asam fitat oleh fitase, dengan media perantara air akan menghasilkan mio inositol dan fosfat anorganik.

Studi tentang fitase sangat pesat pada beberapa tahun terakhir terutama dalam pemanfaatan enzim fitase sebagai campuran pakan ternak guna mereduksi senyawa fitat dalam pakan, sehingga pemanfaatan unsur fosfor dalam tubuh ternak monogastrik menjadi lebih optimal (Greiner *et al.*, 1997).

E. Tinjauan tentang DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

DNA merupakan material genetik yang diturunkan dari generasi ke generasi berikutnya. Gen disusun oleh substansi yang disebut dengan DNA (Muladno, 2002).

DNA merupakan bahan penyusun gen dan makromolekul yang memiliki struktur terdiri atas dua rangkaian nuklotida yang tersusun secara linier. Kedua rangkaian tersebut terbentuk seperti tali berpilin (*double helix*) (Muladno, 2002). DNA tersusun dari tiga komponen yaitu asam fosfat, gula dan basa nitrogen. Gula penyusun DNA adalah gula pentosa, mengandung lima atom karbon C dan berbentuk rantai lurus serta dapat bula berbentuk cincin. Basa nitrogen ini ada dua jenis yaitu dari golongan purin dan pirimidin. Basa nitrogen golongan purin tersiri atas Guanin (G) dan Adenin (A), sedang golongan pirimidin adalah Sitosin/*Cytosine* (C) dan Timin (T). Walaupun ada empat macam tetapi satu molekul gula hanya akan mengikat salah satu jenis basa nitrogen saja (Irawan, 2008).

DNA berfungsi untuk menyimpan informasi genetik secara lengkap yang diperlukan untuk mencirikan struktur semua protein dan RNA tiap-tiap spesies

organisme, untuk membuat program pada saat yang tepat untuk menempatkan biosintesis sel dan komponen jaringan secara teratur dan untuk menentukan kekhususan organisme tertentu (Lehninger, 1994).

F. Tinjauan Tentang Replikasi DNA

Bahan genetik yang ada pada setiap jasad makhluk hidup akan mengalami perbanyakan yang merupakan proses yang sangat penting dalam proses pertumbuhan sel. Proses perbanyakan bahan genetik tersebut dikenal sebagai replikasi DNA. Secara umum replikasi bahan genetik merupakan proses pengkopian rangkaian molekul bahan genetik (DNA atau RNA) sehingga dihasilkan molekul anakan yang sangat identik (Yuwono, 2005).

Model replikasi DNA yang diketahui saat ini adalah model replikasi DNA semikonservatif yang dibuktikan secara eksperimental oleh Mathew Meselson dan Franklin Stahl pada tahun 1958 (Yuwono, 2005). Menurut (Bambang, 2008) sebelum itu sekitar tahun 1950an dikenal tiga pola replikasi DNA yaitu sebagai berikut:

1. Replikasi terjadi secara konservatif. Menurut pola ini DNA pita ganda baru dibentuk di samping pita ganda DNA lama. Caranya pita ganda DNA lama memisah, kemudian masing-masing pita membentuk pasangan baru mengurai melepas dari pita lama dan pita lama kembali ke pasangannya sedang pita baru berpasangan dengan pita baru juga. Berdasarkan pola ini berarti akan ada DNA yang semuanya lama dan ada DNA yang semua merupakan hasil sintesis baru dari bahan yang baru pula.

2. Replikasi secara semikonservatif. Menurut pola ini pita DNA hasil replikasi akan memiliki satu pita lama dan satu pita baru, lebih mudahnya adalah pita ganda DNA membelah menjadi dua pita dan masing-masing pita tersebut membentuk pita DNA baru sebagai pasangannya. Jadi setiap pita ganda DNA baru akan tersusun dari satu pita DNA lama dan satu pita DNA baru.
3. Replikasi secara dispersif. Menurut pola pita DNA akan terpotong-potong, bukan hanya terpisah satu sama lain, kemudian masing-masing potongan akan dilengkapi dengan segmen hasil sintesis baru sehingga terbentuklah pita ganda DNA baru yang merupakan campuran segmen DNA lama dan segmen DNA hasil sintesis baru.

Ketiga pola di atas semuanya menggunakan DNA lama sebagai template atau cetakan untuk mensintesis DNA baru. Dengan menggunakan DNA lama sebagai cetakan untuk mensintesis DNA baru akan sama dengan DNA lama (Bambang, 2008).

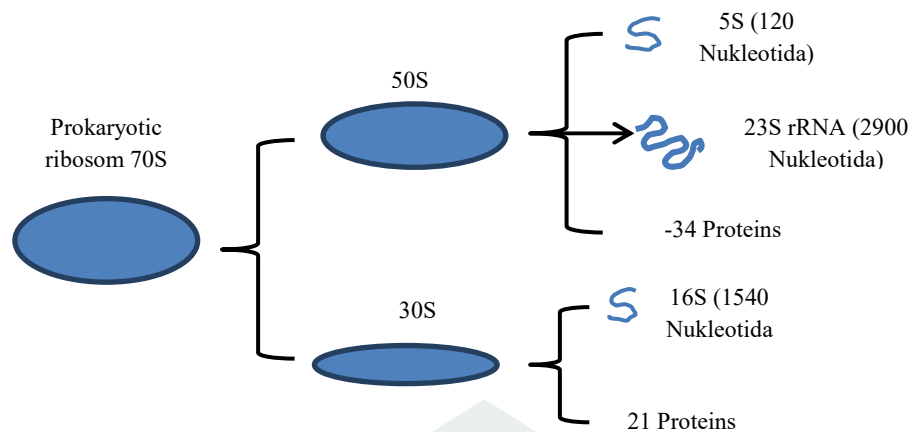
Denaturasi yang terjadi pada saat awal replikasi DNA adalah proses enzimatik. Denaturasi awal terjadi pada bagian DNA yang dikenal sebagai *ori (origin of replication)* atau titik awal replikasi. Ikatan hydrogen antara A-T dan C-G akan terputus dan diikuti dengan pembukaan untai DNA. Untai DNA membuka membentuk struktur yang disebut garpu replikasi (*replication fork*). Garpu replikasi akan bergerak sehingga molekul DNA induk akan membuka secara bertahap. Masing-masing untai DNA induk yang sudah terpisah satu sama lain berfungsi sebagai cetakan untuk penempelan nukleotida-nukleotida yang akan menyusun DNA

baru. Basa nukleotida A akan dipasangkan dengan T yang ada pada cetakannya, sedangkan basa nukleotida C dipasangkan dengan basa nukleotida G. proses polimerisasi nukleotida terjadi pada kedua untai DNA cetakan sehingga pada akhir satu kali putaran replikasi DNA akan dihasilkan dua molekul DNA yang baru yang identik (Yuwono, 2005).

G. Tinjauan Tentang Identifikasi Molekuler Melalui Amplifikasi Gen 16S-rRNA

rRNA (ribosomal RNA) merupakan salah satu jenis molekul dari tiga jenis molekul RNA hasil transkripsi (tRNA, mRNA dan rRNA). rRNA dan protein ribosomal membentuk suatu kompleks menjadi partikel ribonukleoprotein yang disebut ribosom. Ribosom inilah yang berperan dalam sintesis protein (Gaffar, 2007 dalam Arham, 2015).

Ribosom organisme prokariotik merupakan organ sel berukuran 70S dan terdiri dari 2 subunit besar dan kecil berukuran 30S dan 50S, dimana huruf S menyatakan konstanta *Svedberg* yaitu satuan koefisien sentrifugasi (Gambar 2.2). Subunit 30S mengandung rRNA berukuran 16S dan protein sebanyak 21 buah. Sedangkan subunit 50S mengandung rRNA berukuran 5S dan 23S serta protein sebanyak 34 buah (Wulandari, 2011).



Gambar 2.2 Struktur ribosom pada prokariot (Sumber: Usml, 2012 dalam Arham, 2015)

Diantaranya ketiganya, 16S rRNA merupakan rRNA yang paling sering digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, karena panjang basanya ideal yaitu 1540 nukleotida sehingga informasi genetik yang dimilikinya cukup banyak dan lebih mudah diolah (Madigan et al., 1997 dalam Arham, 2015). Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek yaitu 120 nukleotida, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara itu molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang yaitu sekitar 2900 nukleotida, sehingga sulit untuk dianalisis (Pangastuti, 2006).

Molekul rRNA sangat khas karena disusun oleh daerah-daerah konservasi yang lebih tinggi dan lebih secara evolusioner. Beberapa segmen RNA berevolusi sangat lambat sehingga filogeni dari taksa yang berdekatan dapat dikonstruksi kembali. Bagian lain cukup bervariasi sehingga dapat dipakai untuk menggolongkan spesies ke dalam genus. Banyaknya posisi pada molekul 16S rRNA dan 23S rRNA yang berevolusi secara bebas menyediakan data untuk menduga hubungan filogenetik sekelompok mikroba (Drancourt et al., 2000).

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan analisis fenotipik dengan mempelajari sifat fisiologis atau biokimianya (Hadioetomo, 1993) maupun analisis genotipik secara molekuler. Seringkali hasil uji biokimia atau fisiologi tersebut berbeda karena perbedaan ekspresi gen. untuk karakterisasi galur-galur dalam satu spesies perlu dilihat sifat yang paling mendasar dan relatif stabil yang analitik genotipik (Singleton, 1995). Beberapa tujuan identifikasi dengan menggunakan karakter fenotip sebagian besar dapat terpenuhi, namun terdapat juga beberapa keterbatasan dalam mengidentifikasi bakteri secara fenotipik. Seperti adanya bakteri yang pertumbuhannya menyulitkan (tidak dapat dikulturkan), banyaknya variasi morfologi, reaksi biokimia yang berubah-ubah dan belum adanya pengenalan (rekognisi) karakter sebelumnya (Han *et al.*, 2002). Kemajuan teknologi telah mengatasi keterbatasan ini, salah satunya yang diwujudkan yaitu identifikasi dengan cara menganalisis urutan nukleotida 16S ribosomal RNA (16S rRNA) yang muncul sebagai metode identifikasi yang akurat dalam mengidentifikasi bakteri (Drancourt *et al.*, 2000)

Identifikasi menggunakan molekul yang dikode 16S rRNA dikarenakan beberapa alasan yaitu: (1) bersifat universal pada kelompok organisme prokariotik; (2) urutan nukleotidanya bersifat konservatif dan variatif; (3) jumlahnya melimpah dalam sel; (4) memenuhi ukuran untuk perhitungan statistika (tidak terlalu panjang dan tidak terlalu pendek); (5) ketersediaan informasi (data bank/database di GenBank) (Madigan *et al.*, 2008). Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan

basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksikan pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti, 2006).

Kunci untuk mengerti keragaman mikroba adalah sistem klasifikasi yang dapat diandalkan. Secara tradisional, bakteri diklasifikasikan terutama berdasarkan sifat-sifat fenotipik. Akan tetapi hasilnya tidak selalu dapat diandalkan secara filogeni. Metode molekuler terutama klasifikasi dan identifikasi berbasis filogenetik, menggunakan parameter yang tidak bergantung pada kondisi pertumbuhan media yang digunakan. Pendekatan yang umum dipakai saat ini adalah analisis sekuen gen 16S rRNA (Case *et al.*, 2007).

Identifikasi bakteri dengan 16S rRNA dilakukan berdasarkan perbandingan urutan basa yang konservatif. Jika urutan basa memiliki persamaan yang tinggi maka strain dapat dimasukkan dalam satu spesies yang sama. Hasil analisis BLASTn terhadap gen 16S rRNA yang mempunyai homologi urutan kurang dari 98% menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies berbeda, homologi antara 93-95% menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan berada pada genus yang berbeda dan homologi antara 89-93% menunjukkan spesies yang dibandingkan berada pada famili yang berbeda. Data urutan basa dari berbagai spesies mikroba telah dikumpulkan dalam sebuah database yang dapat diakses. Kumpulan data spesies tersebut memuat data klasifikasi, diagnosa dilakukan analisis

berdasarkan perasamaan urutan basa menggunakan jarak matrik, metode yang sering digunakan adalah *Multiple Sequence Alignment* (MSA), sebuah metode yang akan mengelompokkan suatu strain berdasarkan derajat kesamaan urutan basa antar spesies (Wulandari, 2011).

Didasarkan pada prinsip amplifikasi gen 16S rRNA dengan teknik PCR menggunakan DNA template yang diisolasi dari lingkungan dapat dibuat pustaka klon gen tersebut. Sekuen gen 16S rRNA selanjutnya dapat digunakan untuk menduga sifat-sifat organisme yang belum dapat dikulturkan; mengidentifikasi model untuk kultivasi (dari kerabat dekat); sintesis pelacak oligonukleotida untuk tujuan identifikasi; pemisahan morfologi; fisik; deteksi pertumbuhan spesifik dalam kultur campuran, memantau distribusinya di alam dan mengevaluasi laju pertumbuhan relative in situ; dan survei keragaman hayati dengan cepat dan komprehensif. Karena kemudahan dan kecepatannya, saat ini teknik PCR digunakan secara luas sebagai metode pilihan untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik. Terdapat beberapa primer universal yang umum digunakan untuk mengamplifikasikan gen 16S rRNA bakteri, diantaranya 23F dan 24F serta 1392R dan 1492R (penomoran primer mengikuti konsensus sekuen 16S rRNA E.coli). Marchesi *et al.*, (1998) mendesain dan mengevaluasi primer 63F dan 1387R untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan ukuran sekitar 1300 pasang basa. Kedua primer ini berhasil mengamplifikasikan gen 16S rRNA dari spesies yang secara teoritis menunjukkan derajat mismatch pada ujung 5' lebih tinggi apabila dibandingkan dengan pasangan 27F-1392R. keberhasilan tersebut juga menunjukkan konsistensi untuk mengamplifikasikan gen

16S rRNA dari template DNA yang diisolasi dari organisme yang tergolong dalam Coryneform, Micrococcus (Gram positif, High G+C).

H. Tinjauan Tentang PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985 seorang peneliti dari CETUS Corporation. Mullis mendapat hadiah Nobel pada tahun 1993 untuk pengembangannya terhadap PCR (Novel, 2010). Reaksi polimer berantai atau PCR adalah suatu proses perbanyakan DNA secara in vitro enzimatis dengan pengontrolan suhu (Weising *et al.*, 2005) sedangkan menurut (Yuwono, 2006) PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu atau DNA dengan cara in vitro. PCR juga merupakan suatu reaksi in vitro untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim polimerase dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu termocycler. Primer yang berada sebelum daerah target disebut primer forward dan yang berada setelah daerah target disebut primer reverse. Primer umumnya mempunyai panjang 9 sampai 25 basa dan menentukan situs dimulainya replikasi DNA (Stansfield *et al.*, 2006). Teknik PCR digunakan untuk memperbanyak sekuen DNA tertentu dengan waktu relatif singkat. Dengan PCR, molekul DNA dapat diperbanyak sampai jutaan kopi. Oleh karena itu teknik ini bisa disebut amplifikasi DNA (Muladno, 2002).

PCR adalah teknik cepat untuk mengamplifikasikan fragmen DNA spesifik secara *in vitro* dengan menggunakan sepasang primer untai tunggal pendek (primer *forward* dan *reverse*). Sejumlah kecil fragmen DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) yang diinginkan dapat diamplifikasi secara berulang-ulang sampai jutaan kali dalam beberapa jam menggunakan teknik ini. PCR merupakan metode yang sensitif, selektif, dan cepat dalam menggandakan DNA target yang diinginkan (Murray *et al.*, 2003), sehingga dari satu pasang molekul DNA dapat diperbanyak menjadi jutaan kali lipat setelah 30-40 siklus PCR (Campbell *et al.*, 2002). Dalam prosesnya PCR dapat secara cepat mengubah temperatur yang dibutuhkan untuk siklus berulang. Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam proses PCR yaitu DNA target (DNA cetakan yang akan diamplifikasi), sepasang primer oligonukleotida (primer *forward* dan *reverse*), enzim Taq DNA polymerase yang tahan panas, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTP) serta larutan penyangga (buffer) (Muladno, 2002).

Tujuan dari PCR adalah untuk membuat sejumlah besar duplikasi suatu gen. hal ini diperlukan agar diperoleh jumlah DNA cetakan awal yang cukup untuk sekuensing DNA ataupun untuk memperoleh material genetik yang diperlukan dalam proses rekayasa genetika. Tahapan pengerjaan PCR secara umum terdiri dari isolasi DNA/RNA, pengecekan integritas isolat DNA/RNA secara spektrofotometri atau elektroforesis, pencampuran komponen fraksi PCR, pemrograman mesin PCR pada kondisi optimum, amplifikasi reaksi dan deteksi/evaluasi hasil reaksi (Sari, 2006). Cara kerja PCR dimulai dari pengikatan dua oligonukleotida (primer) yang telah

diketahui komposisinya ke suatu sekuens target yang diinginkan. Kemudian, DNA polimerase akan memperpanjang oligonukleotida tersebut. Setiap reaksi akan diulang setelah tahap denaturasi sehingga terjadilah amplifikasi (penguatan) secara eksponensial (Stansfield, 2006).

PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri atas tiga tahap berurutan yaitu pemisahan utas DNA pada suhu yang tinggi (denaturasi), penempelan (annealing) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan primer (extension) atau reaksi polimerisasi yang dikatalis oleh DNA polymerase. Ketiga tahap tersebut masing-masing memerlukan suhu yang berbeda. Tahapan-tahapan tersebut adalah sebagai berikut:

1. Pemisahan DNA (Denaturasi)

Tahap ini merupakan tahap pengudaran DNA utas ganda menjadi DNA utas tunggal, dimana masing-masing untai dapat mencetak pasangannya (komplementer). Hal tersebut disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi yang menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Tahap denaturasi biasanya berlangsung antara suhu 94°C hingga 96°C dilakukan sampai 5 menit untuk memastikan semua utas tunggal sebagai DNA terpisah. Semakin panjang untaian rantai DNA, semakin lama waktu yang diperlukan untuk tahap denaturasi (Berg *et al.*, 2007).

2. Penempelan primer pada cetakan DNA (Annealing)

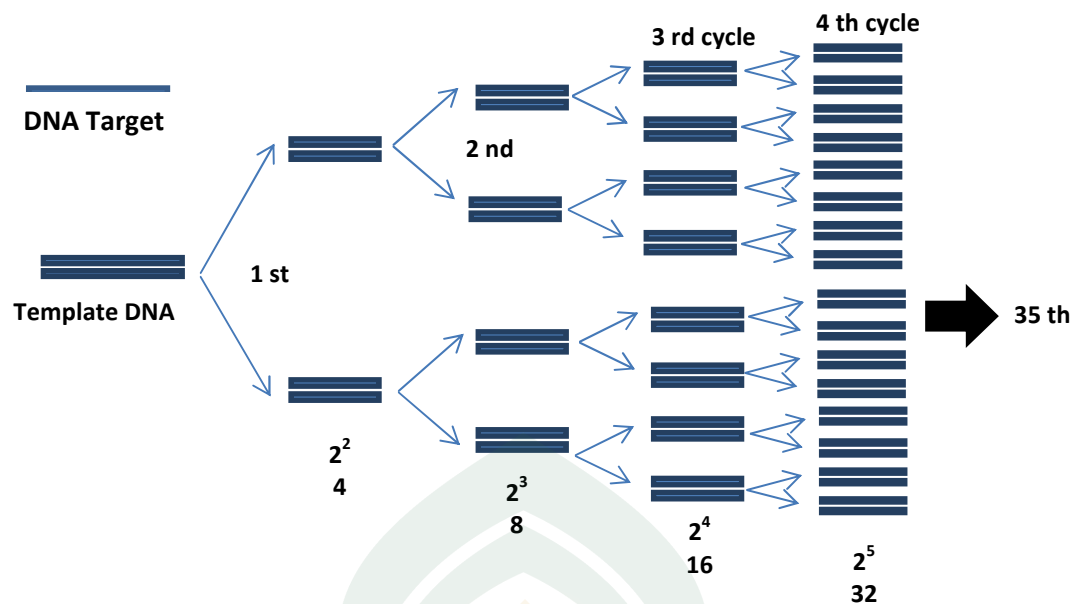
Tahap ini merupakan tahap penempelan primer pada utas DNA cetakan yang telah terdenaturasi menjadi utas tunggal akibat kecocokan pasangan basa. Primer

menempel pada bagian DNA cetakan yang memiliki urutan basa komplementer dengan urutan basa primer. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template. Tahap annealing biasanya dilakukan pada suhu sekitar 42°C hingga 65°C. selanjutnya DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada suhu 72°C.

3. Pemanjangan primer DNA (Extension)

Setelah primer menempel pada utas tunggal DNA cetakan, maka DNA polimerase akan mensintesis utas DNA yang baru berdasarkan utas DNA cetakan. DNA polimerase mulai mensintesis DNA dengan mengikatkan deoksinukleotida pada ujung 3'-OH dari primer, sehingga arah pertumbuhan utas DNA yang baru adalah 5'-P ke 3'-OH. Sintesis DNA atau pemanjangan primer ini dilakukan pada suhu cukup tinggi, yaitu sekitar 72°C supaya tahap berikutnya (denaturasi protein) relatif lebih mudah dan enzim Taq DNA polimerase dapat bekerja optimal.

Di dalam proses PCR, terjadi siklus yang berulang. 1 copy DNA setelah satu siklus akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4 copy, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 copy dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Gaffar, 2007). Hasil amplifikasi dapat dilihat Seperti pada gambar 2.3, siklus PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus.



Gambar 2.3 Ilustrasi amplifikasi PCR (Sumber: Vierstraete, 1999 dalam Arham, 2015)

I. Tinjauan Tentang Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Yuwono, 2005). Teknik elektroforesis selalu memiliki dua komponen utama, yaitu medium penyangga (kertas atau gel) dan larutan buffer. Fungsi medium penyangga adalah sebagai reseptor titik dari senyawa-senyawa yang akan dipisahkan dan menyediakan jalur bagi migrasi komponen. Sedangkan fungsi buffer sebagai konduktor arus yaitu jembatan konduksi di antara dua elektroda, sehingga memungkinkan terjadinya aliran medan listrik dan menstabilkan pH (Sari, 2006).

Produk PCR adalah ampikon (segmen DNA) yang berada dalam jumlah jutaan copy, tetapi tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Oleh karena itu, perlu

adanya visualisasi produk PCR yaitu dengan cara elektroforesis gel agarosa. Selain untuk mendeteksi, elektroforesis gel agarosa juga bertujuan untuk mengetahui ukuran ampikon dan mengetahui kesesuaian ampikon dengan yang diinginkan (Gaffar, 2007 dalam Arham, 2015).

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk mengetahui keberadaan dan membedakan jenis asam nukleat yang didapat dari hasil ekstraksi serta digunakan untuk menganalisis produk hasil pemotongan dengan enzim restriksi. Prinsip dasar elektroforesis adalah berdasarkan laju perpindahan suatu molekul oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekulnya, semakin kecil molekulnya akan semakin cepat lajunya, begitu pula sebaliknya. Sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur pada gel yang berada di dalam larutan penyangga dan dialirkan listrik pada tegangan tertentu. Molekul-molekul sampel akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai muatannya. Arah pergerakan untuk RNA dan DNA adalah menuju elektroda positif karena adanya muatan negatif pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya (Berg *et al.*, 2007).

Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan untuk teknik lebih lanjut, seperti kloning. Ukuran DNA dapat ditentukan dengan menyertakan marka atau penanda yang digunakan pada proses elektroforesis. Setelah tahap elektroforesis selesai, dilakukan metode pewarnaan dan penghilangan warna. Metode pewarnaan pada DNA dan RNA merupakan pewarnaan gel agarosa yang

dilakukan dengan menggunakan larutan ethidium bromida selama 15 menit. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar molekul sampel berpendar dalam sinar ultraviolet. Penghilangan warna dilakukan dengan cara gel dimasukkan ke dalam aquadest selama 5 hingga 7 menit (Manz *et al.*, 2004).

Kecepatan migrasi DNA ditentukan oleh beberapa faktor yaitu ukuran molekul DNA, konsentrasi agarosa, konformasi DNA, voltase yang digunakan, adanya ethidium bromida di dalam gel dan komposisi larutan buffer. Di dalam proses elektroforesis komponen bahan kimia terpenting yang digunakan dalam proses tersebut adalah gel (Sambrook, 2001). Elektroforesis DNA akan lebih baik menggunakan medium penyangga berupa gel buatan seperti poliakrilamida atau agarosa. Agarosa bersifat tidak toksik, kompleks berupa bubuk yang terdiri atas campuran dua unit dasar alaktosa, agarosa dan agaropketin. Gel agarosa lebih mudah dalam preparasinya daripada poliakrilamida. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam elektroforesis bervariasi antara 0,5%-2%. Gel agarosa dengan konsentrasi kurang dari 0,5% sangat rapuh dan sulit ditangani (Sari, 2006).

J. Tinjauan Tentang Sekuensing (Penentuan Urutan Basa Nitrogen)

DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida. DNA sequencing adalah penentuan sekuens nukleotida dalam molekul DNA (Novel *et al.*, 2010). Metode sekuensing merupakan salah satu terobosan utama dalam genetika biologi molekuler yang dapat mensekuensing potongan DNA secara cepat (Muladno, 2002). DNA target yang telah diamplifikasi dengan bantuan PCR akan diskuensing

sehingga urutan basa nukleotida yang dikode akan diketahui, yang nantinya dapat dijadikan bahan untuk identifikasi spesies suatu bakteri.

Pada dasarnya ada dua macam metode sekuensing yang telah dikembangkan, yaitu metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger yang keduanya diperkenalkan pada tahun 1977. Kedua metode tersebut mempunyai prinsip kerja yang berbeda, namun sama-sama menghasilkan suatu kumpulan besar DNA yang dimulai pada suatu titik dan berakhir pada titik lainnya (Novel *et al.*, 2010). Metode sekuensing yang paling banyak digunakan adalah metode Sanger. Selain lebih mudah, praktis dan efisien, metode Sanger juga sudah banyak digunakan dan jutaan nukleotida dari berbagai spesies telah berhasil disekuensing dengan metode ini (Muladno, 2002).

Pada metode Sanger dikenal dengan metode terminasi rantai dan metode Maxam-Gilbert dikenal dengan metode degradasi kimia (Brown, 2002 dalam Arham, 2015). Metode Maxam-Gilbert melibatkan degradasi kimia terhadap fragmen DNA yang akan disekuensing. Mula-mula molekul DNA rantai ganda yang akan disekuensing diberi label salah satu ujungnya menggunakan fosfat radioaktif, fragmen DNA yang sudah diberi label pada salah satu ujungnya dipotong tak sempurna (*partial digest*) dalam empat reaksi kimia terpisah. Tiap reaksi membuat fragmen DNA tersebut terpotong pada basa tertentu. Ini menghasilkan empat macam populasi fragmen DNA yang semua ujungnya berlabel. Tiap populasi terdiri atas campuran fragmen DNA yang panjangnya ditentukan oleh lokasi basa tertentu disepanjang fragmen DNA yang disekuensing tersebut. Populasi fragmen DNA tersebut dipisahkan dengan cara elektroforesis melalui gel polyacrilamida dan fragmen DNA yang

berlabel pada ujungnya tersebut akan terdeteksi melalui cara autodiografi (Muladno, 2002). Metode degradasi kimia (*Maxam-Gilbert*) memiliki kelemahan yaitu menggunakan bahan kimia yang beracun dan berbahaya bagi kesehatan peneliti, sehingga hal ini merupakan alasan mengapa saat ini penentuan urutan basa nukleotida (sekuensing) lebih banyak yang menggunakan metode Sanger.

Pada metode Sanger reaksi sekuensing dimulai dengan reaksi PCR untuk memperbanyak fragmen DNA. Pada prinsipnya metode Sanger menggunakan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Untuk mensintesis molekul DNA, diperlukan dNTP (*Deoxynucleoside Triphosphates*) sebagai bahan utamanya, sedangkan untuk menghentikan proses sintesis diperlukan ddNTP (*Dideoxynucleoside Triphosphates*) (Muladno, 2002). Metode Sanger memanfaatkan dua sifat enzim DNA polimerase yaitu kemampuan untuk mensintesis DNA dengan adanya dNTP dan ketidakmampuan membedakan antara dNTP dan ddNTP (Sanger *et al.*, 1977).

Fragmen-fragmen DNA dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamid. Setelah itu dilakukan pembacaan hasil elektroforesis. Pembacaan hasil elektroforesis dapat dilakukan bila fragmen-fragmen DNA yang terbentuk terlabeli. Pada awal perkembangan teknik DNA sekuensing, pelabelan fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan radioisotop (Gaffar, 2007 dalam Arham, 2015). Label juga dapat berbentuk fluoresen. Pelabelan dapat dilakukan terhadap primer maupun pada ddNTP. Pelabelan yang dilakukan pada ddNTP (*dye terminator labeling*) memberikan kemudahan karena reaksi sekuensing dilakukan hanya dalam satu

tabung. Lain halnya jika pewarnaan fluoresen dilakukan pada primer, reaksi pembentukan fragmen DNA harus dilakukan dalam empat tabung terpisah (Gaffar, 2007). Fragmen-fragmen yang berfluoresen terbentuk karena inkorporasi ddNTP yang berlabel oleh pewarna. Masing-masing ddNTP yang berbeda (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) akan membawa sebuah warna yang berbeda. Dengan demikian semua fragmen yang diterminasi oleh metode Sanger (yang berujung pada ddNTP) mengandung sebuah dye pada ujung 3'nya.

Saat ini dengan bantuan teknologi semua dapat dilakukan dengan otomatis dan cepat dengan bantuan mesin sequencer, dengan divariasi menggunakan pewarna berfluoresensi pada ddNTP dan dideteksi menggunakan detektor yang terhubung dengan komputer sehingga langsung dapat diolah (Brown, 2010 dalam Arham, 2015). Dengan ditemukannya mesin *Automated Capillary Sequencer*, proses pemisahan fragmen dan pembacaan urutan basa DNA dapat dilakukan dengan lebih mudah, cepat dan otomatis. Hasil pembacaan mesin sequencer disebut elektroferogram yaitu peak-peak berwarna yang menunjukkan urutan basa DNA-nya.

K. Tinjauan Umum Tentang Pohon Filogenetika

Sistematika memiliki peran sentral di dalam Biologi dalam menyediakan sebuah perangkat pengetahuan untuk mengkarakterisasi organisme dan sekaligus merekognisinya dalam rangka memahami keanekaragaman. Secara fundamental, sistematika bertujuan untuk memahami dan mendeskripsikan keanekaragaman suatu organisme dan merekonstruksi hubungan kekerabatannya terhadap organisme

lainnya, dan juga mendokumentasikan perubahan-perubahan yang terjadi selama evolusinya dan merubahnya ke dalam sebuah sistem klasifikasi yang mencerminkan evolusinya tersebut. Oleh karena itu, salah satu tugas yang penting dari sistematika adalah merekonstruksi hubungan evolusi (*evolutionary relationship*) dari kelompok-kelompok organisme biologi. Sampai saat ini ada dua pendekatan untuk merekonstruksi hubungan evolusi dari sebuah kelompok organisme biologi, yaitu fenetik dan kladistik. Kladistik sering disebut atau ditulis di dalam literature ilmiah sebagai filogenetika dan merupakan pendekatan yang umum digunakan di dalam banyak penelitian sistematika (Hidayat dan Adi, 2006).

Evolusi merupakan perubahan secara berangsur-angsur atau perlahan-lahan yang terjadi dalam jangka waktu yang sangat lama. Teori Evolusi ini jugalah yang menciptakan sebuah konsep bahwa awalnya seluruh makhluk hidup di bumi ini mempunyai satu nenek moyang yang sama. Nenek moyang yang sama membuat makhluk hidup di bumi ini seharusnya juga berbagi sebuah kode genetik yang sama seperti leluhurnya. Melalui teori evolusi ini, dapat disimpulkan bahwa makhluk hidup mempunyai nenek moyang yang sama dan berbagi beberapa unsur yang sama. Pengertian nenek moyang yang sama inilah yang menjadi dasar dari pembuatan pohon Filogenetik (Mirabella, 2012).

Dalam sistem biologis, proses evolusi melibatkan mutasi genetik dan proses rekombinan dalam spesies untuk membentuk spesies yang baru. Sejarah evolusi organisme dapat diidentifikasi dari perubahan karakternya. Karakter yang sama adalah dasar untuk menganalisis hubungan satu spesies dengan spesies lainnya.

Pohon filogenetik adalah pendekatan logis untuk menunjukkan hubungan evolusi antara organisme. Filogenetika diartikan sebagai model untuk merepresentasikan sekitar hubungan nenek moyang organisme, sekuen molekul atau keduanya (Dharmayanti, 2011). Pohon filogenetik merupakan pohon yang menggambarkan hubungan antara spesies diurutkan menurut nenek moyang terakhir yang paling dekat dengan spesies tersebut. Dalam pohon Filogenetik ini akan terlihat seberapa dekatnya sebuah spesies dengan spesies yang lainnya. Hubungan kekerabatan antara spesies akan terlihat jelas dalam pohon Filogenetik (Mirabella, 2012).

Di dalam pendekatan filogenetika, sebuah kelompok organisme dimana anggota-anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang. Nenek moyang dan semua turunannya akan membentuk sebuah kelompok monofiletik. Dalam analisis filogenetika kelompok outgroup sangat dibutuhkan dan menyebabkan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan dan terdapat pada ingroup, sedangkan karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada outgroup. Karakter sinapomorfik adalah karakter yang diturunkan dan terdapat pada kelompok monofiletik (Hidayat dan Adi, 2006).

Salah satu tujuan dari penyusunan filogenetika adalah untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (Dharmayanti, 2011). Melalui filogenetik, dapat diamati dengan lebih jelas bagaimana evolusi dapat terjadi, bahkan

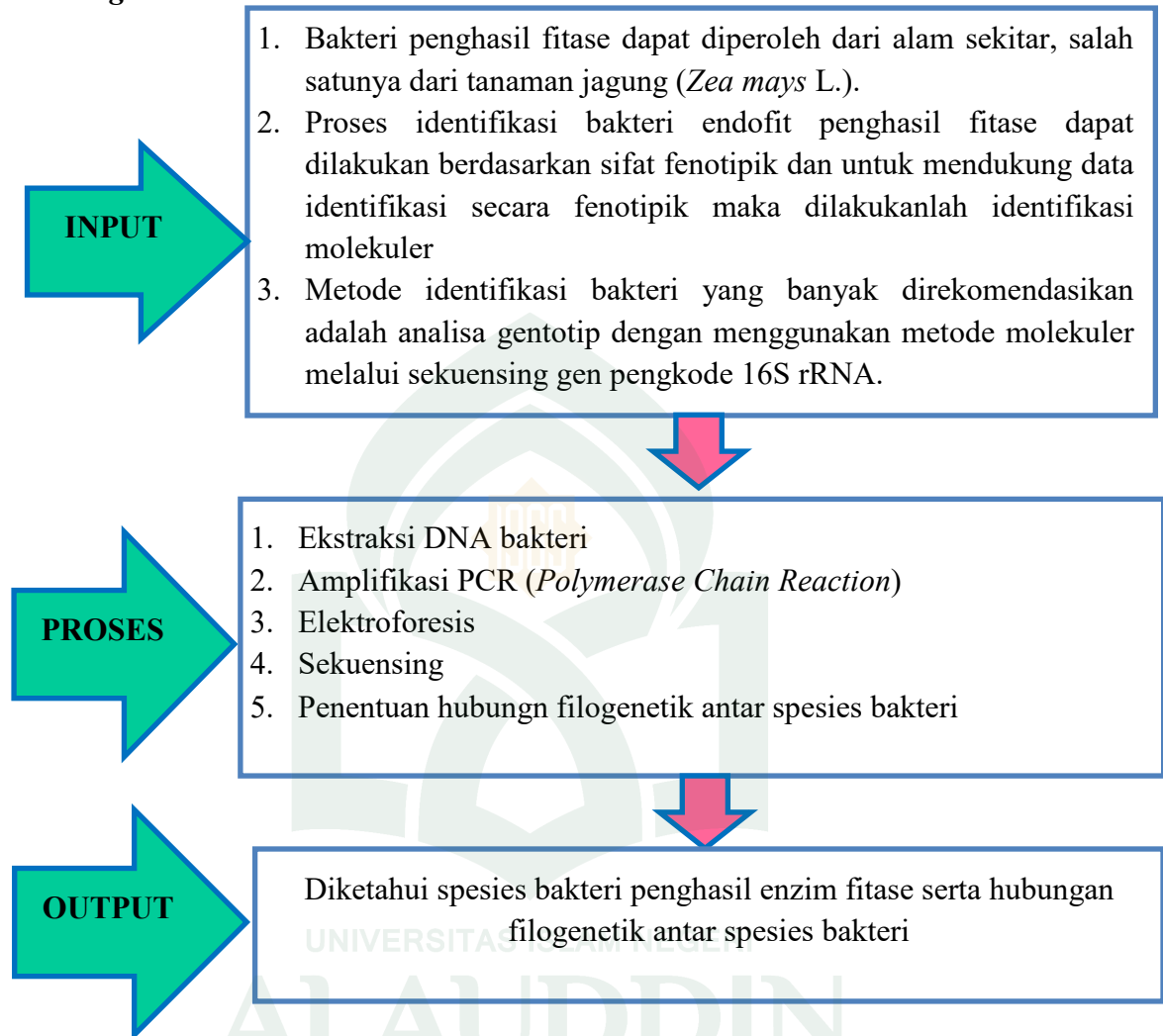
bagaimana alur evolusi itu terjadi pada makhluk hidup. Bagaimana kedekatan makhluk hidup yang satu dengan yang lainnya, bagaimana dapat terjadinya perubahan dari satu organisme menjadi organisme lainnya, kapan kira-kira perpisahan dari nenek moyang itu terjadi, dan banyak hal lainnya dapat dilihat melalui pendekatan dengan filogenetik ini (Mirabella, 2012).

Filogenetika molekuler mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan filogenetika. Pemikiran dasar penggunaan sikuen DNA dalam studi filogenetika adalah bahwa terjadi perubahan basa nukleotida menurut waktu, sehingga akan dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan akan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu kelompok organisme dengan yang lainnya. Beberapa alasan mengapa digunakan sikuen DNA: (1) DNA merupakan unit dasar informasi yang mengkode organisme; (2) relatif lebih mudah untuk mengekstrak dan menggabungkan informasi mengenai proses evolusi suatu kelompok organisme, sehingga mudah untuk dianalisis; (3) peristiwa evolusi secara komparatif mudah untuk dibuat model; dan (4) menghasilkan informasi yang banyak dan beragam, dengan demikian akan ada banyak bukti tentang kebenaran suatu hubungan filogenetika (Hidayat dan Adi, 2006).

Analisis filogenetika molekuler merupakan proses bertahap untuk mengolah data sikuen DNA atau protein sehingga diperoleh suatu hasil yang menggambarkan estimasi mengenai hubungan evolusi suatu kelompok organisme. Ada sejumlah asumsi yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sikuen DNA atau protein ke analisis, diantaranya yaitu (1) sikuen berasal dari sumber yang spesifik, apakah

dari inti, kloroplas atau mitokondria; (2) sikuen bersifat homolog (diturunkan dari satu nenek moyang); (3) sikuen memiliki sejarah evolusi yang sama (misalnya bukan dari campuran DNA inti dan mitokondria); dan (4) setiap sikuen berkembang secara bebas (Hidayat dan Adi, 2006).

Saat ini, pembuatan pohon filogenetik dengan pendekatan DNA sudah dipermudah dengan program yang telah dibuat oleh para ilmuwan. Hanya dengan mengcopy kode DNA beberapa spesies kedalam program, maka kita bisa mendapatkan pohon filogenetik yang dibutuhkan. Contoh program yang membantu pembuatan pohon tersebut adalah Mega 7. Melalui kemudahan ini diharapkan perkembangan filogenetik dalam Biologi bisa makin maju (Mirabella, 2012).

L. Kerangka Pikir

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif deskriptif. Adapun lokasi penelitian yaitu bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains FMIPA Universitas Hasanuddin. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2016 sampai Januari 2017.

B. Pendekatan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksploratif yaitu untuk mengetahui spesies bakteri panghasil enzim fitase hasil isolat dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) dengan cara mengidentifikasi hasil isolat bakteri secara molekuler.

C. Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel tunggal yaitu hasil identifikasi molekuler isolat bakteri penghasil enzim fitase dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) dengan indeks fitatik tertinggi.

D. Definisi Operasional Variabel

Adapun definisi operasional variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bakteri penghasil fitase adalah bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim fitase yang dapat menghidrolisis asam fitat.
2. Identifikasi molekuler berbasis gen 16S rRNA adalah metode yang dilakukan untuk mengetahui secara pasti spesies bakteri penghasil fitase dengan melalui tahapan ekstraksi DNA, PCR, elektroforesis dan sekuensing sehingga dapat diketahui urutan basa nukleotida bakteri penghasil fitase tersebut.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, jarum ose bulat, inkubator, *Laminar Air Flow* (LAF), *hot plate and stirrer*, gelas kimia, gelas ukur, labu erlenmeyer, mikropipet (20 µl, 200 µl dan 1000 µl) dan tip (20 µl, 200 µl dan 1000 µl), *water bath*, pipet tetes, neraca analitik, lemari pendingin, tabung microsentrifuge, tabung PCR, GD column (spin column), centrifuge, alat PCR (DNA *thermal cycler*), alat elektroforesis DNA horizontal, *Gel Doc*, komputer, DNA *sequencer* dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat terpilih bakteri penghasil enzim fitase, sepasang primer universal yang digunakan untuk semua jenis bakteri yaitu forward primer universal *primer forward* 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan *primer reverse* 1387r (5'-GGG CGG AGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi *et al.*, 1997), template DNA, kit ekstraksi DNA (PrestoTM Mini gDNA Bacteria Kit), proteinase K, lysozyme, *gram (+) buffer*, *gram*

(-) *buffer*, GB *buffer*, W1 *buffer*, wash *buffer*, elution *buffer*, etanol absolut 96%, *Master Mix PCR Kit*, Tris borate EDTA (TBE) 10x, DNA ladder 100 bp, *loading dye*, agarose, ddH₂O, ethidium bromide, sarung tangan dan masker.

F. Prosedur Kerja

Adapun prosedur kerja pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Peremajaan Isolat Bakteri Endofit Penghasil Enzim Fitase

Kultur murni isolat bakteri endofit penghasil enzim fitase dengan indeks fitatik tertinggi diremajakan pada media Luria Bertani padat.

2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas fitase tertinggi kemudian diekstrak DNA melalui berbagai proses preparasi sampel, lisis sel, DNA *binding*, wash dan *elution*, dimana langkah-langkah kerjanya berdasarkan protokol dari kit Geneaid yaitu sebagai berikut:

a. Preparasi sampel (*Sampel preparation*)

Sebanyak 1 ose sampel bakteri dimasukkan ke dalam tabung mikrocentrifuge 1,5 mL steril yang telah berisi 200 μ L *gram (+) buffer* yang telah ditambahkan *lysozyme*. Menghomogenkan dengan cara pipetting, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah diinkubasi tabung divortex, kemudian ditambahkan 20 μ L Proteinase K dan 200 μ L *gram (-) buffer* lalu divortex dan diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 10 menit, setiap 3 menit tabung dibolak-balik agar homogen.

b. Melisiskan sel (*Cell lysis*)

Menambahkan 200 μ L GB *Buffer* (Geneaid) lalu divortex dan diinkubasi kembali pada suhu 50°C selama 10 menit, kemudian membolak-balikkan tabung setiap 3 menit.

c. *DNA Binding*

Menambahkan 200 μ L ethanol absolute 96% dan divortex selama 10 detik. Memindahkan semua campuran tersebut ke dalam GD column (spin column) pada 2 ml collection tube kemudian disentrifuge dengan kecepatan 13.100 rpm selama 2 menit. Membuang collection tube yang berada di bawah spin column dan mengganti collection tube yang baru.

d. Pencucian (*Wash*)

Menambahkan 400 μ L *W1 buffer* (Geneaid) lalu disentrifuge pada kecepatan 13.100 rpm selama 30 detik, kemudian membuang cairan yang ada pada collection tube. Menambahkan 600 μ L *wash buffer* dan disentrifuge lagi, lalu membuang cairan pada collection tube dan sentrifuge kembali selama 30 detik lalu membuang cairan pada collection tube. Membuang collection tube yang berada di bawah spin column dan mengganti collection tube yang baru. Kemudian mensentrifuge kembali dengan kecepatan 13.100 rpm selama 3 menit hingga matrix column kering.

e. *Elution*

Menambahkan 100 μ L *Elution buffer* (Geneaid), kemudian mendiamkan selama 3 menit kemudian disentrifuge dengan kecepatan yang sama selama 1 menit.

Cairan yang mengandung DNA yang tertampung pada tabung mikrocentrifuge disimpan pada suhu 4°C untuk digunakan sebagai template PCR.

3. Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro* (di dalam tabung PCR). Prosesnya meliputi 3 tahap yaitu denaturasi, annealing dan ekstention. Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi. “PCR mix” dimasukkan ke dalam tabung PCR:

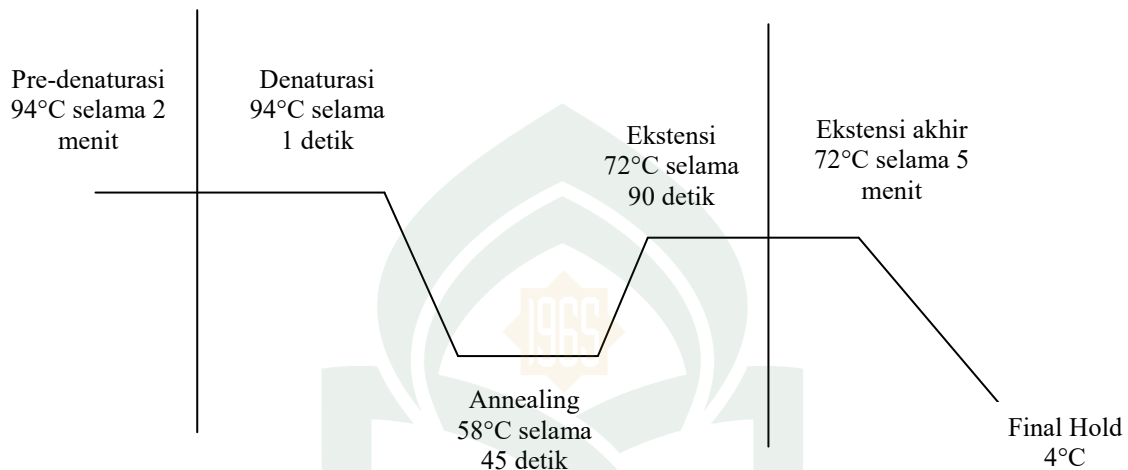
Tabel 3.1 Komposisi PCR mix

Reaksi	(μL)
ddH ₂ O	52
<i>KAPA Master mix</i> PCR	100
63F (<i>Forward primer</i>)	10
1387R (<i>Reverse primer</i>)	10
MgCl ₂	8
DNA template	5
Total PCR mix	180

(Sumber: Sari *et al.*, 2013 dengan sumber primer oleh (Marchesi *et al.*, 1997)

Total PCR mix 45 μL + 5 μL sampel DNA, jadi setiap sampel 50 μL . Kemudian dimasukkan dalam mesin PCR. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (DNA thermal cycler). Untuk amplifikasi PCR, tahap awal pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, selanjutnya denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 58°C selama 45 detik, ekstensi 72°C selama 90

detik sebanyak 35 siklus dilanjutkan dengan ekstensi akhir suhu 72°C selama 5 menit dan final hold pada suhu 4°C.



Gambar 3.1 Proses PCR (Sumber: Sari *et al.*, 2013)

4. Elektroforesis

Proses elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarose. Pembuatan gel agarose dilakukan dengan membuat agarose 2% dengan melarutkan 2 gr agarose dalam 100 mL 10X Tris borate EDTA. Kemudian memanaskannya sampai mendidih dan larut dengan menggunakan *hot plate and stirrer*. Selanjutnya ditambahkan 1 µL ethidium bromida (0,2 µg/mL) dan memasukkan ke dalam pencetak gel yang telah dipasang sisir. Setelah agarosa memadat (membutuhkan waktu sekitar 30 menit) selanjutnya dimasukkan ke dalam tank elektroforesis yang berisi larutan TBE 0,5%. Kemudian memasukkan DNA sampel hasil amplifikasi sebanyak 5 µL, kemudian untuk mengetahui ukuran produk amplifikasi PCR maka dimasukkan marker 100 bp

pada sumur pertama dan diikuti DNA sampel hasil amplifikasi pada sumur kedua dan seterusnya. Ketika memasukkan DNA sampel hasil amplifikasi diperlukan penambahan *loading dye* sebanyak 2 μ L untuk setiap sampel yang berfungsi sebagai pemberat kemudian menghomogenkan DNA sampel dan *loading dye* dengan cara pipetting. Selanjutnya elektroda dihubungkan dengan power supply kemudian menyalakan selama 60 menit dengan tegangan 100 volt. Setelah itu, alat elektroforesis dimatikan kemudian gel diambil. Selanjutnya gel dipindahkan ke dalam alat *gel doc* kemudian hasilnya diamati pada komputer.

5. Sekuensing

Sampel hasil PCR dan primer forward 63F dikirim ke 1st BASE Malaysia untuk disekuensing. Hasilnya berupa sekuen nukleotida sepanjang \pm 1.300 bp. Nukleotida tersebut dimasukkan dalam program BLAST secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk dicocokkan dengan data spesies pada Gen bank. keidentikan yang digunakan pada range 80-100 %. Sekuen *Gene Bank* yang paling mirip; dicirikan dengan nilai *Max Score* dan *Total Score* sama, *Query Coverage* mendekati 100%, *E-value* mendekati 0, dan *Max Ident* mendekati 100%. Untuk melihat tingkat kekerabatan antar spesies dilakukan pensejajaran sekuens menggunakan program Clustal W. selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik dengan metode *neighbor-joining* menggunakan program MEGA 7.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

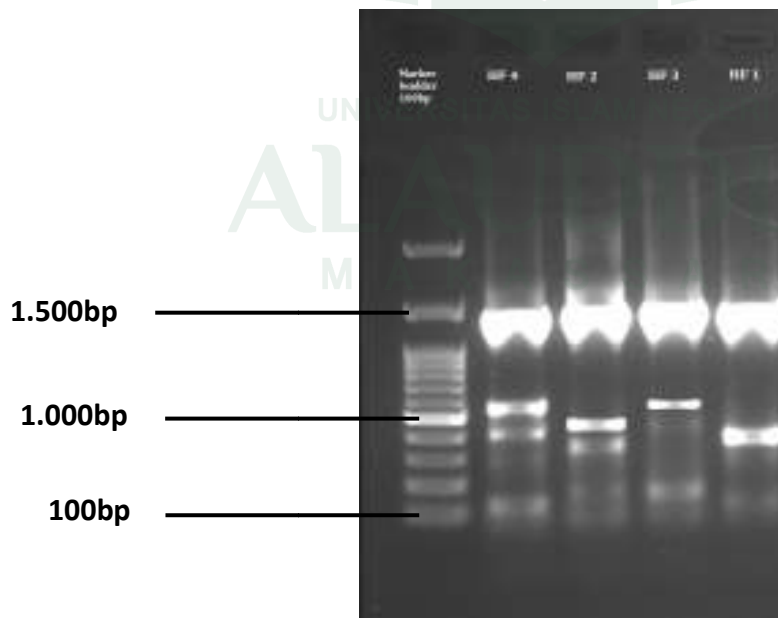
Bakteri endofit dapat diisolasi dari bagian-bagian jaringan tanaman termasuk dari tanaman jagung (*Zea mays* L.). Berdasarkan penelitian Nurhikmah (2017) yang telah mengisolasi bakteri endofit asal tanaman jagung (*Zea mays* L.) dan mendapatkan 4 isolat yang masing-masing mewakili isolat dengan indeks fitatik tertinggi dari setiap sampel organ tanaman jagung (*Zea mays* L.). Kemudian isolat bakteri yang memiliki indeks fitatik tertinggi tersebut diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi dan biokimia. Akan tetapi, karakterisasi morfologi dan biokimia tidak cukup untuk mengidentifikasi spesies masing-masing isolat bakteri endofit sehingga diperlukan karakterisasi secara molekuler sehingga data morfologi dan biokimia ini dapat dijadikan data pendukung untuk menentukan spesies isolat bakteri endofit terpilih tersebut.

Identifikasi molekuler dilakukan pada empat isolat bakteri terpilih yang mempunyai indeks fitatik (IF) tertinggi, dimana masing-masing isolat mewakili setiap organ tanaman jagung (*Zea mays* L.) yaitu akar, batang, daun dan biji, hal ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman spesies bakteri yang terdapat pada satu spesies tanaman jagung (*Zea mays* L.) terutama keanekaragaman bakteri penghasil fitase. Spesies jagung yang digunakan adalah spesies Bima-19 yang berumur 80-110

hari. Adapun isolat-isolat bakteri yang diidentifikasi secara molekuler yaitu isolat bakteri dari akar, biji, daun dan batang dengan indeks fitatik tertinggi (IF) yang diberi kode isolat masing-masing HF 1, HF 2, HF 3 dan HF 4.

Keempat isolat bakteri ini dideterminasi dengan menggunakan primer universal yaitu forward primer 63F dan reverse primer 1387R untuk sekuen 16S-rRNA. Gen 16S-rRNA dianalisis secara lengkap di 1st BASE sequencing INT Malaysia. Analisis cluster pada sekuens tersebut dilakukan dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Adapun hasil elektroforesis dari produk amplifikasi gen 16S-rRNA yang dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*DNA Thermal Cycler*) keempat sampel isolat bakteri penghasil enzim fitase seperti pada gambar berikut:



Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis dari produk Amplifikasi gen 16S-rRNA
HF 1 = ± 900 bp; HF 2 = ± 900 bp; HF 3 = ± 1000 bp; dan HF 4 = ± 1000 bp

Isolat Bakteri HF 1

GCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGT
 GGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGG
 GACCTTCGGGCCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
 AGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAA
 GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTG
 CGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA
 CTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
 AGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACT
 CTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACG
 GACCTTCGGGCCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
 TGTCAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGG
 CGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
 CCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCTAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCTCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTTCATTTCTTAGTAACGTAGCTA
 ACGCGTGAAGGTGACCGCCTGGGGAGTACNGTCGCAAGATTTAAA

Isolat Bakteri HF 2

CTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGA
 GGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTGCAAGACCAAAGAGGGG
 CTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
 GACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA
 CGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGT
 GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
 GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTACG
 GACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA
 GGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCAC
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
 CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
 CTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
 TGTCAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
 CAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGCTTCCGGAGCT
 AACCGGTTNAATCGATCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA-CTCAA-TGAATTGA
 CCGGGGGCCCCGCACNAGCGGTGGGAGCATGTGG-TTATTTCAATGCAACGC
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGC

Isolat Bakteri HF 3

CGGAATTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCCAGT
 AGCGGGGGATAACTACGCGAAAGCGTGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCG
 GGGGACCTTCGGGCCTCGCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGG
 TAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGG
 CAACCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTT
 GGCAGGAAAGAAACGGCGCCAGCTAATACCTGGCGCTAATGACGGTACCTGCAGAATAAG
 CACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA
 TTAAGTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGAGCTT
 AACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTGGAATTCC
 GCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCT
 GGGATAACACTGACGCTCATGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGGCCTTAGTAGCGCAG
 CTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCT
 TACCTACCCTTGACATGTCTGGAATCCCGAAGAGATTTGGGAGTGCTCGCAAGAGAACCG
 GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
 CAACTAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACTAAAGGGCACTCTAATGTAGACTGCCTG
 TTGACAAACCGGAAGAAAGGTGGGGA

Isolat Bakteri HF 4

CTTGCT-CTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCCGATGG
 AGGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGG
 GGACCTCCGGGCCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGCGGGGTA
 ACGGCCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC
 TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
 AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAG
 CGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
 CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
 ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAA
 CCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
 ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 GTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGC
 TAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCTACTCTTGACATCCAGCGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACGCTGA
 GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTTCGGGAACTCAAAGGAAACTGCC
 GGGGATAAACCGGAAGAAgggggggATGACCTCAAGTCATCAGGGCCCTTACGAGAAGGG
 GTAACCACGGGCTACTATG-CTCTATACAAAGAAAA-CTACCTCTCTAGATCAT-CGGAC
 C-CTTAAATTGC-TCTTATTCCGGATCGGAATCT

Gambar 4.2. Urutan basa nukleotida keempat isolat bakteri terpilih hasil sekuensing

Hasil sekuensing yang diperoleh dari malaysia selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan analisis BLAST. Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada database Gen Bank. Analisis BLAST dilakukan secara online pada website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil analisis BLAST dari keempat isolat fitatik seperti pada gambar di bawah ini:

Isolat Bakteri HF 1

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Burkholderia lata strain 263.16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1493	1493	98%	0.0	99%	JF_102890.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia contaminans strain J2956.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1493	1493	98%	0.0	99%	JF_104076.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia spaciis strain 717.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1493	1493	98%	0.0	99%	JF_020209.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia lateris strain R-0630.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	98%	0.0	99%	JF_042632.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia tentorii strain LMG 28150.16S ribosomal RNA, partial sequence	1485	1485	98%	0.0	99%	JF_136496.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia spaciis strain NRRC 14074.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1482	1482	98%	0.0	99%	JF_112649.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia metallica strain R-16017.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1482	1482	98%	0.0	99%	JF_042630.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia aptosa strain R-24201.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1482	1482	98%	0.0	99%	JF_042634.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia spaciis strain ATCC 25416.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1482	1482	98%	0.0	99%	JF_116481.1
<input type="checkbox"/> Burkholderia vietnamiensis strain TV75.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1482	1482	98%	0.0	99%	JF_118972.1

Descriptions

Isolat Bakteri HF 2

, Reading indexes 1-5, displaying indexes 1-5

Load next setPrevious Match

Sequences producing significant alignments:

Show all columns of the table presenting sequences producing significant alignments Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results Multiple alignment Show/hide columns of the table presenting sequences producing significant alignments

Sequences producing significant alignments:

Select for downloading or viewing reports

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_118011.1 Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain ATCC 23375 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1583	1583	97%	0.0	99%	NR_118011.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_117679.1 Enterobacter cloacae strain DSM 30054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1580	1580	97%	0.0	99%	NR_117679.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_113615.1 Enterobacter cloacae strain NBRC 13535.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1580	1580	97%	0.0	99%	NR_113615.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_028912.1 Enterobacter cloacae strain 279-56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1580	1580	97%	0.0	99%	NR_028912.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_044978.1 Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain LMG 2683 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1576	1576	97%	0.0	99%	NR_044978.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_042349.1 Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1572	1572	97%	0.0	99%	NR_042349.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_111998.1 Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1572	1572	97%	0.0	99%	NR_111998.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_102794.1 Enterobacter cloacae strain ATCC 13047 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1570	1570	97%	0.0	98%	NR_102794.1

Descriptions

Reading indexes 1-5, displaying indexes 1-5
 Load next set Previous Match
 Sequences producing significant alignments:
 Show all columns of the table presenting sequences producing significant alignments Select: All None Selected: 0
 Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results Multiple alignment Show/hide columns of the table presenting sequences producing significant alignments

Sequences producing significant alignments:

Select for downloading or viewing reports

Isolat Bakteri HF 3

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_047349.1	Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1435	1435	98%	0.0	98%	NR_047349.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_111998.1	Pantoea agglomerans strain JCM1736 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1435	1435	98%	0.0	98%	NR_111998.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_118011.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain ATCC 23373 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1430	1430	98%	0.0	98%	NR_118011.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_044978.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain IMG 2683 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1428	1428	98%	0.0	98%	NR_044978.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_028993.1	Enterobacter kobei strain CIP 105566 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	98%	0.0	98%	NR_028993.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_117679.1	Enterobacter cloacae strain DSM 30054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	98%	0.0	98%	NR_117679.1
<input type="checkbox"/> Select seq ref NR_113615.1	Enterobacter cloacae strain NBRC 13535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	98%	0.0	98%	NR_113615.1

Isolat Bakteri HF 4

Sequences producing significant alignments:
 Select: All None Selected: 0
 Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii subsp. indologenes strain CIP 104206 16S ribosomal RNA gene, complete sequence		2069	2069	92%	0.0	97%	NR_104920.1
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii strain JCM 2716 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2060	2060	92%	0.0	97%	NR_104920.1
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii strain ATCC 35068 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2060	2060	92%	0.0	97%	NR_044803.1
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii subsp. indologenes strain JCM 2632 16S ribosomal RNA gene, complete sequence		2023	2023	92%	0.0	96%	NR_110206.1
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii strain PD 385 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1971	1971	93%	0.0	95%	NR_110208.1
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii strain 1346 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1960	1960	93%	0.0	95%	NR_026045.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1964	1964	93%	0.0	95%	NR_125461.1
<input type="checkbox"/> Pantoea stewartii strain JCM 2595 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1949	1949	93%	0.0	95%	NR_110206.1
<input type="checkbox"/> Pantoea agglomerans strain IMG 2650 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1943	1943	92%	0.0	95%	NR_110113.1

Gambar 4.3 Hasil analisis BLAST isolat-isolat bakteri HF 1, HF 2, HF 3 dan HF 4

Burkholderia lata strain 383 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Sequence ID: [NR_102890.1](#) Length: 1527 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Next Match	Previous Match
1493 bits(808)	0.0	819/825(99%)	0/825(0%)	Strand Plus/Plus		
Query 12	GCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGT				71	
Sbjct 73	GCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGT				132	
Query 72	GGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAATACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGG				131	
Sbjct 133	GGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAATACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGG				192	
Query 132	GACCTTCGGGCTTCGGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA				191	
Sbjct 193	GACCTTCGGGCTTCGGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA				252	
Query 192	AGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACT				251	
Sbjct 253	AGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACT				312	
Query 252	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGCGAAA				311	
Sbjct 313	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGCGAAA				372	
Query 312	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCT				371	
Sbjct 373	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCT				432	
Query 372	CGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAAATAAGCAC				431	
Sbjct 433	CGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAAATAAGCAC				492	
Query 432	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGGCGTTAATCGGAATTA				491	
Sbjct 493	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGGCGTTAATCGGAATTA				552	
Query 492	CTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGCGGTTTCTAAGACCGATGTGAATCCCCGGGCTCAAC				551	
Sbjct 553	CTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGCGGTTTCTAAGACCGATGTGAATCCCCGGGCTCAAC				612	
Query 552	CTGGGAACCTGCATTGGTGAATGCGAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAATCCACG				611	
Sbjct 613	CTGGGAACCTGCATTGGTGAATGCGAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAATCCACG				672	
Query 612	TGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGAGCCCCCTGGG				671	
Sbjct 673	TGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGAGCCCCCTGGG				732	
Query 672	CCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCTAACAGGATTAGATACCTGGTAG				731	
Sbjct 733	CCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCTAACAGGATTAGATACCTGGTAG				792	
Query 732	TCCACGCTCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTA				891	
Sbjct 793	TCCACGCTCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTA				852	
Query 892	ACGCGTGAAGGTGACCGCTGGGAGTAGCNGTCGAAGATTAAA 936					
Sbjct 853	ACGCGTGAAGGTGACCGCTGGGAGTAGCNGTCGAAGATTAAA 997					

Gambar 4.4 Perbandingan urutan nukleotida isolat bakteri HF 1 (*Query*) dengan bakteri *Burkholderia lata* strain 383 (*Subject*)

Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain ATCC 23373 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [NR_118011.1](#) Length: 1507 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1555 bits(857)	0.0()	850/891(99%)	5/891(0%)	Plus/Plus	
Query 14	CTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAATGCTCTGGGAACTGCCTGATGGA				73
Subject 72	CTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAATGCTCTGGGAACTGCCTGATGGA				192
Query 74	GGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAATACCGCATAAATGTCGCAAGACCAAGAGGGG				193
Subject 133	GGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAATACCGCATAAATGTCGCAAGACCAAGAGGGG				192
Query 134	GACCTTCGGGCTCTTCGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA				193
Subject 193	GACCTTCGGGCTCTTCGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA				252
Query 194	CGGCTACCTAGGCACGATCCCTAGCTGTGTCTGAGAGGATGACCAAGCACA CTGGAAC				253
Subject 253	CGGCTACCTAGGCACGATCCCTAGCTGTGTCTGAGAGGATGACCAAGCACA CTGGAAC				312
Query 254	GAGACA CGGTCCAGACTCCTAC GGGAGGCGACGAGTGGGGAATAT TGCACAAT GGGCGCAA				310
Subject 313	GAGACA CGGTCCAGACTCCTAC GGGAGGCGACGAGTGGGGAATAT TGCACAAT GGGCGCAA				372
Query 314	GCCTGATGACAGCCA TGCCGCGT GTATGAA GAAGGCCCT TCGGGTT GTAAAGTA CTTTCAGC				373
Subject 373	GCCTGATGACAGCCA TGCCGCGT GTATGAA GAAGGCCCT TCGGGTT GTAAAGTA CTTTCAGC				432
Query 374	GGGGAGGAAGGTGT TGTGGTTAATAACCG CAGCAATT GACGTTA CCGCAGAAAGAGCAC				433
Subject 433	GGGGAGGAAGGTGT TGTGGTTAATAACCG CAGCAATT GACGTTA CCGCAGAAAGAGCAC				492
Query 434	CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACCGAGGGTGCAGCGGTTAAT CGGAATTA				493
Subject 493	CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACCGAGGGTGCAGCGGTTAAT CGGAATTA				552
Query 494	CTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGCTCTGTCAAGTCGATGTGAATCCCCGGGCTCAAC				553
Subject 553	CTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGCTCTGTCAAGTCGATGTGAATCCCCGGGCTCAAC				612
Query 554	CTGGGAACCTGCATT CGAAACTGCGAGGCTAGAGTCTT GTAGAGG GGGGTAGAAATCCACG				613
Subject 613	CTGGGAACCTGCATT CGAAACTGCGAGGCTAGAGTCTT GTAGAGG GGGGTAGAAATCCACG				672
Query 614	TGTAGCGGTGAAT GCGTAGAGATCTGGAAGGAATACCG GTGGCGAAGGCGGCGCCCTGGA				673
Subject 673	TGTAGCGGTGAAT GCGTAGAGATCTGGAAGGAATACCG GTGGCGAAGGCGGCGCCCTGGA				732
Query 674	CAAGA CTGACGCT CAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCA AACAGGATTAGATACCTGGTAG				733
Subject 733	CAAGA CTGACGCT CAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCA AACAGGATTAGATACCTGGTAG				792
Query 734	TCCACGCCGTAAACGATGTCAATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT CCGGAGCT				793
Subject 793	TCCACGCCGTAAACGATGTCAATTTGGAGGTTGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT CCGGAGCT				852
Query 794	AACCGTTTAAATCGATCGCTGGGAGTACCGCCGCAAGGTTAAA-CTCAA-TGAATTGA				851
Subject 853	AACCGTTTAAATCGATCGCTGGGAGTACCGCCGCAAGGTTAAA-CTCAA-TGAATTGA				912
Query 852	CCGGGGGCCCCGACNAGCGGTGGGAGCAT GTGG-TTATTTCAATGCAACGC 901				
Subject 913	-CCGGGGGCCCCGACNAGCGGTGGGAGCAT GTGG-TTATTTCAATGCAACGC 961				

Gambar 4.5 Perbandingan urutan nukleotida isolat bakteri HF 2 (*Query*) dengan bakteri *Enterobacter cloacae* subsp. dissolvens Strain ATCC 23373 (*Subject*)

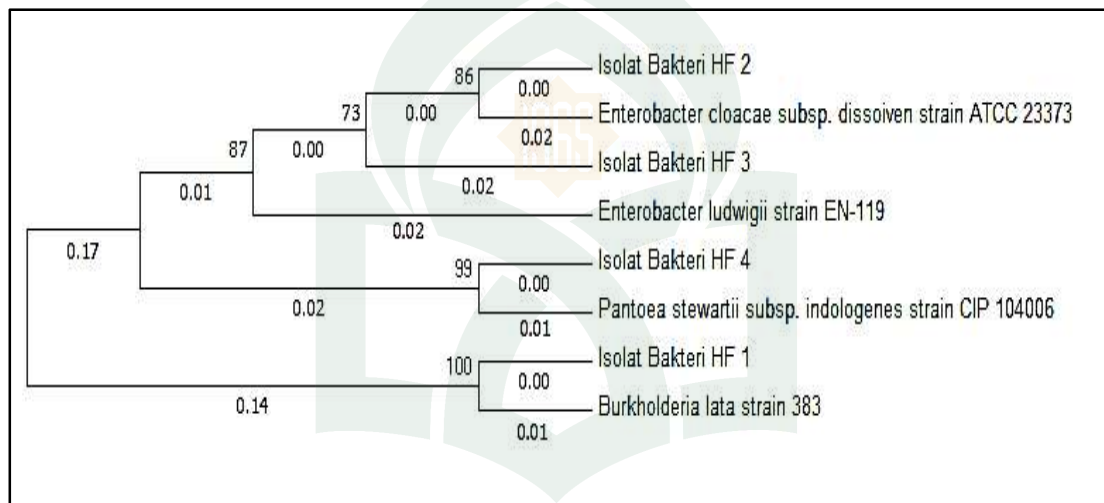
Score		Next Match		Previous Match	
1975 bits (1069)		3/1106 (0%)		3/1106 (0%)	
0.0		1094/1106 (99%)		1094/1106 (99%)	
Gap		Gap		Gap	
1975 bits (1069)		3/1106 (0%)		3/1106 (0%)	
Query	8	CGGAATTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAAGCGGGTGGATTAATGATCGGAAGCGTGCCCAAGT	67		
Sbjct	9	CGGATCTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAAGCGGGTGGATTAATGATCGGAAGCGTGCCCAAGT	68		
Query	68	AGCGGGGGGATAAATCTACGCGAAAGCGTGGCTTAATACCGCATACGCCCTACCGGGGGGAAAGCG	127		
Sbjct	69	AGCGGGGGGATAAATCTACGCGAAAGCGTGGCTTAATACCGCATACGCCCTACCGGGGGGAAAGCG	128		
Query	128	GGGGGACCTTCGGGGCTCGCATCTATTGGAGCGGGCCGATATCGGATAGCTAGTTGGTGGGG	187		
Sbjct	129	GGGGGACCTTCGGGGCTCGCATCTATTGGAGCGGGCCGATATCGGATAGCTAGTTGGTGGGG	188		
Query	188	TAAACGGCTCACCAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCCACACCTGGG	247		
Sbjct	189	TAAACGGCTCACCAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCCACACCTGGG	248		
Query	248	ACTGAGACACGGCGCCAGACTCTCTACGGGAGGACGAGCTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGG	307		
Sbjct	249	ACTGAGACACGGCGCCAGACTCTCTACGGGAGGACGAGCTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGG	308		
Query	308	CAACCTTGATCCAGCGCTCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGACACTTTT	367		
Sbjct	309	CAACCTTGATCCAGCGCTCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGACACTTTT	368		
Query	368	GGCAGGAAAGAAAGCGCGCCAGCTTAATACCTGGCGCTTAATGACGGGTACCTCGAGAATAAG	427		
Sbjct	369	GGCAGGAAAGAAAGCGCGCCAGCTTAATACCTGGCGCTTAATGACGGGTACCTCGAGAATAAG	428		
Query	428	CACCGGCTTAACCTGCGCCAGCAGCGCGGCTTAATACGTAGGCTGCAAGCGTTAATCGGAA	487		
Sbjct	429	CACCGGCTTAACCTGCGCCAGCAGCGCGGCTTAATACGTAGGCTGCAAGCGTTAATCGGAA	488		
Query	488	TTAATGGCGCTTAACCTGCGCCAGCAGCGCGGCTTAATACGTAGGCTGCAAGCGTTAATCGGAA	547		
Sbjct	489	TTAATGGCGCTTAACCTGCGCCAGCAGCGCGGCTTAATACGTAGGCTGCAAGCGTTAATCGGAA	548		
Query	548	AACTTTGGACATTCGATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTGACAGGGAGGTGGAATTC	607		
Sbjct	549	AACTTTGGACATTCGATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTGACAGGGAGGTGGAATTC	608		
Query	608	CGGTGTAGCAGTGAAGTTCGTAGATATCGGAGGAAACCGATGGCGGAGGCGAGCTTCT	667		
Sbjct	609	CGGTGTAGCAGTGAAGTTCGTAGATATCGGAGGAAACCGATGGCGGAGGCGAGCTTCT	668		
Query	668	GGGATAACACTGACGCTCATGACAGCAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGG	727		
Sbjct	669	GGGATAACACTGACGCTCATGACAGCAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGG	728		
Query	728	TAGTCCACGCGCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGGCCTTAGTAGCGCAN	787		
Sbjct	729	TAGTCCACGCGCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGGCCTTAGTAGCGCAN	788		
Query	788	CTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGAAGATTAAACCTCAAGGGAATTT	847		
Sbjct	789	CTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGAAGATTAAACCTCAAGGGAATTT	848		
Query	848	GACGGGGACCGCGCAAGACCGGTGGATGTGGAATTAATCGATCAACCGCGAAAAACCT	907		
Sbjct	849	GACGGGGACCGCGCAAGACCGGTGGATGTGGAATTAATCGATCAACCGCGAAAAACCT	908		
Query	908	TACCTACCCCTTGACATGTCTGGAAATCCGGAAGAGATTGGGGAGTGCTCGCAAGAGAACCT	967		
Sbjct	909	TACCTACCCCTTGACATGTCTGGAAATCCGGAAGAGATTGGGGAGTGCTCGCAAGAGAACCT	968		
Query	968	GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGTAGATGTGGGTTAAGTCCCG	1027		
Sbjct	969	GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGTAGATGTGGGTTAAGTCCCG	1028		
Query	1028	CAACTAGCGCAACCCCTTGTCAITAGTTGCTACTAAAGGGCACTCTAATGTAGACTGCGTG	1087		
Sbjct	1029	CAACGCGCGCAACCCCTTGTCAITAGTTGCTACTAAAGGGCACTCTAATGTAGACTGCGTG	1087		
Query	1088	TTGACAAACCGGAAGAAAGGTTGGGA 1113			
Sbjct	1088	-TGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGA 1111			

Gambar 4.6 Perbandingan urutan nukleotida isolat bakteri HF 3 (*Query*) dengan bakteri *Enterobacter ludwigii* strain EN-119 (*Subject*)

Pantoea stewartii subsp. indologenes strain CIP 104006 16S ribosomal RNA gene, complete sequence						
Sequence ID: NR_104928.1 Length: 1524 Number of Matches: 1						
Range 1: 73 to 1305	GapBank	Graphics	Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Identities	Caps	Strand	Plus/Minus	
2069 bits(1120)	0.0	1198/1235(97%)	8/1235(0%)	Plus/Plus		
Query 10	CTTGTCT-CTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGGATGG				68	
Sbjct 73	CTTGTCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGAATGG				132	
Query 69	AGGGGGATAACTACTTGGAAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAAGTGGG				128	
Sbjct 133	AGGGGGATAACTACTTGGAAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAAGTGGG				192	
Query 129	GGACCTTCGGGGCTTACACCAATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGGTAGCCGGGGGTA				188	
Sbjct 193	GGACCTTCGGGGCTTACACCAATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGGTAGCCGGGGTA				252	
Query 189	ACGGCCCACTTAGGGCAGCATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCCAGCCACACTTGGAAAC				248	
Sbjct 253	ACGGCCCACTTAGGGCAGCATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCCAGCCACACTTGGAAAC				312	
Query 249	TGAGACACGGTCCAGACTCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCA				308	
Sbjct 313	TGAGACACGGTCCAGACTCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCA				372	
Query 309	AGCCTTGATCGGCCCATGCCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAG				368	
Sbjct 373	AGCCTTGATCGGCCCATGCCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAG				432	
Query 369	CGGGGAGGAAGGTTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCA				428	
Sbjct 433	CGGGGAGGAAGGTTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCA				492	
Query 429	CCGGCTAACTCCGTCGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGGTGCACGCGTTAATCGGAATT				488	
Sbjct 493	CCGGCTAACTCCGTCGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGGTGCACGCGTTAATCGGAATT				552	
Query 489	ACTGGGGCTAAAGCCGACAGCAGGCGGCTCTGTTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGGCTTAA				548	
Query 549	CTTGGGCACTGCATTTGAACCTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGCTAGAATTCGAG				608	
Sbjct 613	CTTGGGCACTGCATTTGAACCTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGCTAGAATTCGAG				672	
Query 609	GTGTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCGCTGG				668	
Sbjct 673	GTGTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCGCTGG				732	
Query 669	ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACACAGGATTAGATACCCCTGGTA				728	
Sbjct 733	ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACACAGGATTAGATACCCCTGGTA				792	
Query 729	GTCCACGCCGTAAACGATGTGCAGCTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGC				788	
Sbjct 793	GTCCACGCCGTAAACGATGTGCAGCTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGC				852	
Query 789	TAAACGCGTTAAGTTCGACGCCCTTGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTG				848	
Sbjct 853	TAAACGCGTTAAGTTCGACGCCCTTGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTG				912	
Query 849	ACGGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGACCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGCGAAGCACTT				908	
Sbjct 913	ACGGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGACCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGCGAAGCACTT				972	
Query 909	ACCTACTCTTGACATCCAGCGCAACTTCCAGAGATGGATTGGTGGCTTCGGGAACGCTGA				968	
Sbjct 973	ACCTACTCTTGACATCCAGCGCAACTTCCAGAGATGGATTGGTGGCTTCGGGAACGCTGA				1032	
Query 969	GACAGGTTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCTGTTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA				1028	
Sbjct 1033	GACAGGTTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCTGTTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA				1092	
Query 1029	CGAGCGCAACCCCTTATCCCTTGTGTGCGAGCGATTCCGGTCGGGAACCTAAAGGAAACCTGCC				1088	
Sbjct 1093	CGAGCGCAACCCCTTATCCCTTGTGTGCGAGCGATTCCGGTCGGGAACCTAAAGGAAACCTGCC				1152	
Query 1089	GGGGATAAACCGGAAGATGCGGGGATGACCTCAAGTCATCAGGCGCCCTACGAGAGAGGG				1148	
Sbjct 1153	GGGGATAAACCGGAAGATGCGGGGATGACCTCAAGTCATCAGGCGCCCTACGAGTAGGG				1212	
Query 1149	GTAACCAACGGGCTACTATG-CTCTATACAAAGAAAA-CTACCTCTCTAGATCAT-CCGAC				1205	
Sbjct 1213	CTTACACAGTGTCTACAAATGGCGC-ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAC				1271	
Query 1206	C-CTTAAAAATTGC-TCTTATTCCGATCGGAATCT	1238				

Gambar 4.7 Perbandingan urutan nukleotida isolat bakteri HF 4 (*Query*) dengan bakteri bakteri *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* strain CIP 104006 (*Subject*)

Setelah semua spesies isolat terpilih bakteri penghasil fitase teridentifikasi semua selanjutnya dilakukan analisis pohon filogenetik yang bertujuan untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya. Adapun hasil analisis pohon filogenetik spesies isolat-isolat bakteri penghasil fitase seperti pada gambar di bawah ini:



Gambar 4.8 pohon filogeni kelompok isolat bakteri penghasil fitase menggunakan metode *neighbor-joining* berdasarkan hasil analisis 16S-rRNA

B. Pembahasan

Proses identifikasi bakteri penghasil enzim fitase dapat dilakukan berdasarkan sifat fenotipik yang didasarkan pada hasil pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis (pewarnaan gram), uji fisiologis atau metabolik (biokimia). Namun demikian, identifikasi bakteri berdasarkan karakter fenotip maupun biokimia telah diketahui memiliki kelemahan, yaitu sering terjadi perbedaan dalam pembacaan hasil

identifikasi. Selain itu karakter fenotip yang sama belum tentu menunjukkan bakteri yang sama juga. Begitu juga karakter biokimia yang merupakan karakter yang dapat berubah oleh adanya stress akibat pengaruh lingkungan (tidak statis) sehingga dapat menyebabkan evolusi (Ochman, 2005). Oleh karena itu, dilakukan identifikasi secara molekuler agar diperoleh hasil yang lebih spesifik yaitu dengan melihat urutan basa nukleotidanya setiap spesies. Metode identifikasi bakteri yang banyak direkomendasikan adalah analisa genotip dengan menggunakan metode molekuler antara lain melalui sekuensing gen pengkode 16S-rRNA dengan teknik PCR (*Polymerase chain reaction*).

Dalam proses identifikasi molekuler mikroorganisme terdapat 4 proses utama yang paling dasar yaitu ekstraksi DNA, PCR, dan elektroforesis serta tahap paling penting yaitu sekuensing. Tahap ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya, sehingga diperoleh DNA murni. Isolasi/ekstraksi DNA diperoleh dengan cara merusak atau memecahkan dinding sel sehingga DNA akan keluar dari dalam sel.

Pada tahap ekstraksi terjadi pemisahan benang-benang DNA dengan komponen sel yang lain. Proses ekstraksi DNA yang dilakukan memacu pada pedoman instruksi manual oleh geneaid dengan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Di dalam prosedur manual ini ada beberapa proses penting dalam ekstraksi yaitu preparasi sampel (*sample preparation*), lisis sel (*cell lysis*), pengikatan DNA (*DNA binding*), pencucian (*wash*) dan elusi (*elution*).

Kit komersial Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit menggunakan prinsip mini column atau filtrasi DNA. Pertama dinding sel dihancurkan, untuk bakteri gram positif menggunakan *gram (+) buffer* yang telah ditambahkan lysozyme sedangkan untuk bakteri gram negatif menggunakan *gram (-) buffer* dan proteinase K. Sel dilisis menggunakan *lysis buffer* (buffer GB). DNA diendapkan dengan ethanol absolut, difilter, dan dicuci dengan *washing buffer* (buffer W1 dan buffer wash). Terakhir, DNA dilarutkan dalam *elution buffer*. Ekstraksi DNA dengan mini column merupakan metode ekstraksi yang paling umum dilakukan karena hasil yang didapatkan sangat baik dalam waktu yang tidak lama dan biaya yang lebih murah.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini memiliki fungsi yang berbeda-beda. *Gram (+) buffer* (Geneaid) yang telah ditambahkan lysozyme berfungsi khusus untuk menghancurkan dinding sel bakteri gram positif, penambahan *buffer* bertujuan untuk menjaga keadaan pH tetap stabil sehingga DNA tidak rusak selama pengerjaan. Proteinase K yang berfungsi menghancurkan komponen sel (terutama protein) dan *Gram (-) buffer* (Geneaid) fungsinya khusus untuk menghancurkan dinding sel bakteri gram negatif. *GB Buffer* (Geneaid) berfungsi untuk melisiskan sel bakteri. Etanol absolut digunakan untuk mengendapkan atau pemekatan DNA. *Wash buffer* digunakan untuk membersihkan DNA dari pengotor lain.

Tahap selanjutnya adalah proses PCR yang bertujuan untuk melipat gandakan suatu pita DNA secara *in-vitro*. Dalam pengerjaannya terdapat reaksi berantai yaitu denaturasi, annealing dan elongasi (Irawan, 2008). Proses PCR ini dilakukan sebanyak 35 siklus selama ± 2 jam. Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu

ddH₂O, *KAPA Master Mix*, primer forward (63F), primer reverse (1387R), MgCl₂ serta DNA sampel yang telah diskstraksi. *KAPA Master mix* PCR komersial ini berfungsi sebagai komponen atau campuran DNA template yang akan diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Primer Forward berfungsi untuk menginisiasi sintesis untai DNA dari ujung 5' ----- 3' sedangkan Primer Reverse berfungsi untuk Menginisiasi sintesis untai DNA dari ujung 3' ----- 5'. Fungsi *DNA template* di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. MgCl₂ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. ddH₂O berfungsi sebagai pelarut DNA.

Tahap selanjutnya yaitu elektroforesis DNA yang merupakan suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Yuwono, 2005). Hasil dari proses ekstraksi dan PCR dapat dilihat dengan cara elektroforesis yaitu dengan melihat ketebalan pita DNA sampel tersebut. Dari elektroforesis tersebut dapat dilihat panjang base pair (bp) setiap sampel dengan menggunakan bantuan marker (penanda). Tahap elektroforesis dilakukan selama 40 menit 100 volt pada gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Adapun bahan yang digunakan dalam proses elektroforesis yaitu agarose, *buffer*, marker 100bp, *loading dye* dan *Ethidium bromide*. Agarose sebagai reseptor titik dari senyawa-senyawa yang akan dipisahkan dan menyediakan jalur bagi migrasi komponen. *Buffer* berfungsi sebagai konduktor arus yaitu jembatan konduksi di antara dua elektroda, sehingga memungkinkan terjadinya aliran medan listrik dan menstabilkan pH. Marker DNA

yang terdapat dalam gel elektroforesis berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi dan sebagai penanda posisi molekul DNA yang bermigrasi untuk menentukan perkiraan ukuran basa-basanya. Loading dye berfungsi sebagai pemberat agar tidak keluar dari sumuran. Etidium bromida sebagai pewarna DNA.

Dari hasil elektroforesis kedua sampel yaitu kode isolat HF 1 dan HF 2 diketahui pita yang tersperasi dan sejajar dengan marka sekitar $\pm 900\text{bp}$. Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang teramplifikasi pada isolat adalah dengan ukuran $\pm 900\text{bp}$, sedangkan sampel dengan kode isolat HF 3 dan HF 4 diketahui terdapat pita yang terseparasi dan sejajar dengan marka sekitar $\pm 1.000\text{bp}$. Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang teramplifikasi pada isolat adalah dengan ukuran $\pm 1.000\text{bp}$. Selanjutnya, hasil dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia yang kemudian akan dikirim ke 1st BASE sequencing INT di Malaysia untuk pemetaan pasang basa yang berhasil di amplifikasi. Hasil yang diperoleh dari malaysia selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan analisis BLAST.

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada database Gen Bank. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi mengenai bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Analisis BLAST dilakukan secara online pada website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2016): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ciri-ciri sekuen dari gene bank yang paling mirip dengan sekuen DNA yang diperoleh yaitu, nilai *Max Score* dan *Total Score* sama,

Query Coverage mendekati 100%, *E-value* mendekati 0, dan *Identities* mendekati 100%. Dari keempat parameter tersebut, nilai *Query Coverage* yang paling penting karena menunjukkan persentase database yang tertutupi oleh *Query*. Apabila nilai *E-Value* semakin mendekati nol, hasilnya akan lebih terpercaya dan bila nilainya 1, maka tidak boleh digunakan (Narita, 2012).

Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa *Max Score* dan *Total Score*, *Query Coverage*, *E-value* dan *Identities*. *Max Score* dan *Total Score* adalah jumlah keselarasan semua segmen dari urutan database yang cocok dengan urutan nukleotida. Nilai skor menunjukkan keakuratan nilai penjajaran sekuens berupa nukleotida yang tidak diketahui dengan sekuens nukleotida yang terdapat di dalam Gen Bank. Semakin tinggi nilai skor yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sekuens. *Query coverage* adalah persentase dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST. Nilai *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuens. Nilai *E-value* yang semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antara sekuens semakin rendah, sedangkan nilai *E-value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi. Nilai *E-value* bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekuens tersebut identik. *Identities* adalah nilai tertinggi dari persentase identitas atau kecocokan antara sekuens *query* dengan sekuens database yang tersejajarkan (Narita, 2012).

Hasil analisis BLAST dari keempat isolat bakteri penghasil fitase seperti pada gambar 4.3, menunjukkan bahwa spesies dari koloni bakteri isolat HF 1 merupakan

bakteri *Burkholderia lata* strain 383 dengan nilai *maximum score* 1493, *total score* 1493, *query coverage* 98% dan *identities* 99%. Koloni bakteri isolat HF 2 merupakan bakteri *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* Strain ATCC 23373 dengan nilai *maximum score* 1583, *total score* 1583, *query coverage* 97% dan *identities* 99%. Koloni bakteri isolat HF 3 KL-3 merupakan bakteri *Enterobacter ludwigii* Strain EN-119 dengan nilai *maximum score* 1435, *total score* 1435, *query coverage* 98% dan *identities* 98%. Koloni bakteri Isolat HF 4 merupakan bakteri *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* strain CIP 104006 dengan nilai *maximum score* 2069, *total score* 2069, *query coverage* 92% dan *identities* 97%.

Setelah keempat spesies-spesies tersebut teridentifikasi selanjutnya dilakukan analisis pohon filogenetik yang bertujuan untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (Liu *et al.*, 1999).

Analisis pohon filogenetik dilakukan melalui dua tahap dengan menggunakan program Clustal W yang dikombinasikan dengan program MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Tahap pertama menggunakan program Clustal W untuk mensejajarkan sekuen kedua isolat bakteri kitinolitik dengan isolat-isolat dari Gen Bank yang memiliki sekuens mirip dengan isolat-isolat yang telah disekuensing. Kemudian program MEGA 7 akan membuat pohon filogenetiknya dengan metode pendekatan “*Neighbour Joining*”, bootstrap 1000x, dan metode p-distance. Pohon filogenetik ini dibentuk menggunakan metode *neighbor-joining* yang termasuk dalam metode jarak dengan prinsip pengelompokkan taksa berdasarkan nilai jarak

evolusioner pasangan-pasangan operational taksonomi unit dimana setiap percabangan yang terdapat dalam pohon filogenetik berevolusi pada kecepatan yang tidak sama (Hartl, 2000).

Hasil analisis filogenetik menggunakan sekuens DNA pengkode 16S-rRNA seperti yang terlihat pada gambar 4.8, diketahui bahwa isolat HF 2 paling dekat dengan *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* strain ATCC 23373 dengan jarak genetik 0,02 (dekat) dan nilai Bootstrap 86, isolat HF 3 paling dekat dengan *Enterobacter ludwigii* strain EN-119 dengan jarak genetik 0,02 (dekat) dan nilai bootstrap 87, isolat HF 4 memiliki kedekatan dengan *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* strain CIP 104006 dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai bootstrap 99 sedangkan isolat HF 1 paling dekat dengan *Burkholderia lata* strain 383 dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai bootstrap 100 dibandingkan dengan bakteri jenis lainnya yang ada di Gen Bank. Nilai bootstrap merupakan nilai yang digunakan untuk menguji seberapa baik set data model yang kita gunakan. Jika nilai bootstrap rendah, maka sekuens seharusnya dikeluarkan dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogeni yang dapat dipercaya (Dharmayanti, 2011). Semakin besar nilai bootstrap, maka semakin tinggi pula tingkat kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi tersebut (Nei and Kumar, 2000). Jika antara spesies memiliki nilai bootstrap 100 artinya kedua isolat ini dapat disimpulkan berkerabat sangat dekat secara genetik dan kemungkinan keduanya adalah spesies yang sama begitupula sebaliknya.

Pohon filogeni mengelompokkan isolat-isolat yang diteiti menjadi kelompok kecil dan kelompok besar. Pengelompokan kecil merupakan pengelompokan yang

didasarkan pada spesies-spesies bakteri yang diteliti dengan spesies bakteri yang mirip dengan bakteri yang diteliti yang terdapat dalam Gen Bank. Kelompok kecil terdiri atas 8 spesies yaitu 4 isolat-isolat bakteri penghasil fitase yang terdiri atas isolat bakteri HF 1, HF 2, HF 3 dan HF 4 serta spesies bakteri yang mirip dengan isolat-isolat bakteri penghasil fitase yang terdiri atas *Burkholderia lata*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter cloacae* dan *Pantoea stewartii subsp. indologenes*. Sedangkan pengelompokan dalam kelompok besar didasarkan pada kelompok famili bakteri-bakteri tersebut. Berdasarkan kelompok besar terdiri atas 2 kluster yaitu kluster dari famili Burkholderiaceae dan kluster dari famili Enterobacteriaceae. Kluster 1 terdiri atas isolat bakteri HF 1 sedangkan kluster 2 terbagi menjadi sub-sub kluster yang terdiri atas isolat-isolat bakteri HF 2, HF 3 dan HF 4. Dalam pembentukan kluster-kluster ini tidak ada kecenderungan pengelompokan isolat-isolat berdasarkan varietas tanaman inangnya ataupun organ tanaman inangnya. Kluster-kluster yang terbentuk tersebut menunjukkan kekhususan pada sifat gram dan juga identitas bakteri lainnya. Kedekatan antara bakteri-bakteri terjadi karena adanya kemiripan urutan basa nukleotida isolat-isolat bakteri penghasil fitase. Selain itu pengelompokan kluster-kluster tersebut diperjelas dengan adanya hasil biokimia Nurhikmah (2017) dimana dalam hasil biokimia yang diperoleh menjelaskan adanya persamaan hasil uji biokimia dari isolat-isolat HF 2, HF 3 dan HF 4 sedangkan isolat HF 1 menunjukkan hasil biokimia yang sangat berbeda dari ketiga isolat tersebut. Hasil uji biokimia isolat bakteri HF 1 yaitu uji TSIA, uji H₂S, uji motilitas, uji indol, uji MR, uji VP dan uji fermentasi karbohidrat laktosa menunjukkan hasil negatif sedangkan uji

katalase, uji citrate serta uji fermentasi karbohidrat manitol dan glukosa menunjukkan hasil positif. Sedangkan hasil uji biokimia isolat bakteri HF 2, HF 3 serta HF 4 menunjukkan hasil positif untuk uji TSIA, uji katalase, uji motilitas, uji VP, uji citrate dan ketiga uji fermentasi karbohidrat (laktosa, manitol dan glukosa) sedangkan uji H₂S, uji indol menunjukkan hasil negatif, akan tetapi terdapat perbedaan dari hasil uji MR dimana hanya isolat HF 4 yang menunjukkan hasil positif sedangkan isolat HF 2 dan HF 3 menunjukkan hasil negatif. Selain hasil dari uji biokimia keempat isolat tersebut pengelompokan kluster-kluster tersebut menjadi 2 kluster diperkuat dengan klasifikasi masing-masing isolat bakteri dimana isolat HF 2, HF 3 dan HF 4 berada dalam satu famili yang sama yaitu Enterobacteriaceae sedangkan isolat HF 1 berada dalam famili yang berbeda dari ketiga isolat yang diidentifikasi yaitu isolat HF 1 berada pada famili Burkholderiaceae.

Berikut ini akan dibahas tentang deskripsi spesies bakteri yang telah disekuensing, akan tetapi berdasarkan referensi yang ada bakteri *Burkholderia lata*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* dan *Pantoea stewartii* belum ada yang melaporkan bahwa spesies dari bakteri-bakteri tersebut merupakan bakteri penghasil fitase. Hal ini dikarenakan, enzim fitase merupakan enzim induktif, dimana ketika suatu bakteri diinduksikan pada substrat yang mengandung fitat maka bakteri yang dapat menghidrolisis fitat akan membentuk zona bening yang merupakan indikator bakteri penghasil fitase. Induksi fitase tergantung pada dua hal, yaitu ketersediaan Na-Fitat atau Ca-Fitat dan tidak adanya fosfat anorganik dalam media (Kusumadjaja, 2009).

1. *Burkholderia lata*

Genus *Burkholderia* tersebar luas diberbagai ekologi, namun paling banyak ditemukan dalam tanah dan menunjukkan interaksi *non-patogenic* terhadap tanaman. *Burkholderia* juga mampu melarutkan mineral dalam tanah dengan menghasilkan asam organik, serta meningkatkan ketersediaan nutrisi untuk tanaman sehingga sangat menjanjikan untuk dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi (Rambola et al. 2014). *Burkholderia* adalah genus bakteri endofit yang paling sering ditemui dan mampu menghasilkan senyawa bioaktif, salah satunya berpotensi sebagai senyawa antimikroba (Ryan et al., 2007).

Burkholderia lata merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang dan merupakan bakteri aerobik. Koloni bakterinya bersifat lembab serta berpigmen kuning dan terkadang ada yang berpigmen kuning-keunguan. Bakteri ini dapat tumbuh baik pada suhu 30°C-37°C dan tidak dapat bertahan pada suhu 40°C (Vanlaere, et al., 2009).

Klasifikasi dari bakteri *Burkholderia lata* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Beta Proteobacteria
Order	: Burkholderiales
Family	: Burkholderiaceae
Genus	: Burkholderia
Species	: <i>Burkholderia lata</i> (Vanlaere, et al., 2009)

Burkholderia lata memiliki aktivitas oksidase dan lisin dekarboksilase, tetapi tidak ada aktivitas tryptophanase, arginin dihydrolase atau kegiatan urease dalam metabolismenya. Beberapa strain dari *Burkholderia lata* dapat mengasimilasi D-glucose, D-manosa, D-manitol, N-asetilglukosamin, D-Burkholderiagluconate, adipat, L-malat dan sitrat, sedangkan asimilasi maltosa, L-arabinosa, kaprat dan phenylacetate tergantung dari strain dari *Burkholderia lata*. Pengasaman dari D-glukosa, maltosa, laktosa dan xylose sedang dalam proses pengamatan. Pengasaman dari sukrosa dan adonitol tergantung strain dari organisme ini. Reduksi nitrat tergantung strain dari organisme tersebut (Vanlaere *et al.*, 2009).

Dari beberapa laporan mengenai bakteri-bakteri dari genus *Burkholderia*, bahwa bakteri-bakteri dari genus *Burkholderia* tersebut mampu berasosiasi dengan *rhizosphere* tanaman dan bakteri dari spesies ini dilaporkan juga dapat berkontribusi untuk pertumbuhan tanaman dengan membebaskan fosfat dari senyawa organik tanah seperti asam fitat (Unno *et al.*, 2005). Meskipun beberapa strain dari genus *Burkholderia* dilaporkan dapat mendegrasi asam fitat (Unno *et al.*, 2005). Akan tetapi hanya ada satu laporan yang melaporkan tentang karakteristik enzim fitase yang dihasilkan dari genus *Burkholderia* tersebut yaitu bakteri *Burkholderia* sp strain a13 (Graminho *et al.*, 2014).

Enzim murni yang dihasilkan oleh bakteri *Burkholderia* sp strain a13 menunjukkan aktivitas spesifik 174.1 U mg⁻¹. Enzim fitase yang dihasilkan dari bakteri tersebut adalah monomer. Kondisi optimal suhu dan pH bakteri *Burkholderia*

sp strain a13 dalam menghasilkan enzim fitase adalah pada suhu 45-55°C dan pH 4,5. Enzim fitase dapat stabil pada suhu 4°C (Graminho *et al.*, 2014).

Penelitian tentang bakteri *Burkholderia lata* dan pemanfaatannya masih sangat jarang dilakukan. Sampai saat ini belum pernah ada penelitian yang melaporkan bahwa *Burkholderia lata* dapat menghasilkan enzim fitase sehingga hasil penelitian ini memberikan bukti penemuan baru bahwa bakteri *Burkholderia lata* yang diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) bagian akar dapat menghasilkan enzim fitase.

2. *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae termasuk kelompok Enterobacteriaceae yang merupakan bakteri gram negatif. Menurut Yoon *et. Al* (1996) bakteri *Enterobacter* sp. dapat menghasilkan enzim fitase. Akan tetapi bakteri *Enterobacter cloacae* belum ada yang melaporkan bahwa bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim fitase.

Klasifikasi dari bakteri *Enterobacter cloacae* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Order : Enterobacteriales
 Family : Enterobacteriaceae
 Genus : Enterobacter
 Species : *Enterobacter cloacae* (Yoon, *et al.*, 1996)

Beberapa penelitian melaporkan kemampuan yang dimiliki oleh bakteri *Enterobacter cloacae* diantaranya yaitu bakteri tersebut memiliki kemampuan

menghambat penetasan telur nematoda 64.39 sampai 85.17% (Tuminem, 2016), memiliki potensi dalam menghasilkan hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) (Triplett (2006). Selain itu, Elbeltagy *et al.* (2001) telah melaporkan bahwa bakteri endofit *Enterobacter cloacae* terbukti meningkatkan fiksasi nitrogen pada tanaman padi. Selain penghasil hormon IAA dan memiliki kemampuan dalam meningkatkan fiksasi nitrogen, *Enterobacter cloacae* dilaporkan mampu menghasilkan enzim *L-Histidine Decarboxylase* (HDC) (Mangunwardoyo, *et al.*, 2007).

3. *Enterobacter ludwigii*

Enterobacter ludwigii merupakan bakteri endofit yang masuk dalam karakteristik umum dari genus *enterobacter*. Bakteri *Enterobacter ludwigii* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil, motil dan memiliki kemampuan fermentasi (Hoffmann *et al.*, 2005).

Klasifikasi dari bakteri *Enterobacter ludwigii* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Enterobacter
Species	: <i>Enterobacter ludwigii</i> (Yoon, <i>et al.</i> , 1996)

Menurut Yoon *et. al* (1996) bakteri *Enterobacter* sp. dapat menghasilkan enzim fitase. Akan tetapi penelitian yang melaporkan bahwa bakteri *Enterobacter*

ludwigii dapat menghasilkan enzim fitase belum ada ditemukan. Hanya penelitian-penelitian tentang beberapa kemampuan-kemampuan yang dimiliki oleh bakteri *Enterobacter ludwigii*.

Beberapa penelitian melaporkan kemampuan yang dimiliki oleh bakteri *Enterobacter ludwigii* diantaranya memiliki aktivitas sebagai *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB) (Labrador, *et al*, 2014), memiliki kemampuan menghambat terbentuknya puru berkisar antara 0 sampai 4 puru/rumpun akar (Tuminem, 2016). Schoebitz *et al.* (2007) melaporkan bahwa bakteri *Enterobacter ludwigii* yang diisolasi dari rizosfer rumput *Lolium perenne* L. menunjukkan aktivitas pelarut fosfat, penambat nitrogen dan menghasilkan hormon pertumbuhan IAA.

4. *Pantoea stewartii subsp. indologenes*

Pantoea stewartii subsp. indologenes merupakan bakteri gram negatif dan bersifat nonmotil (Block, 1999). *Pantoea stewartii* merupakan bakteri yang berbentuk basil, serta bakteri ini tumbuh optimum pada suhu 37°C dan terdapat beberapa strain dapat tumbuh pada suhu 40°C bahkan terdapat juga strain yang dapat tumbuh pada suhu 44°C (Mergaert, 1993).

Menurut Brady *et.al* (2007) genus dari *Pantoea* ada yang bersifat patogen pada tumbuhan dan ada yang bersifat menguntungkan (berasosiasi) dengan tanaman lain. Spesies dari *Pantoea stewartii subsp. indologenes* dapat berasosiasi dengan rumput sorgum (Sudangrass).

Klasifikasi dari bakteri *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Order : Enterobacteriales
 Family : Enterobacteriaceae
 Genus : *Pantoea*
 Species : *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* (Bradya, *et al.*, 2007)

Dari genus *Pantoea* terdapat bakteri yang dilaporkan dapat menghasilkan enzim fitase tetapi bukan dari spesies *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* melainkan spesies *Pantoea agglomerans*. *Pantoea agglomerans* terbukti dapat menurunkan kandungan fitat dalam pakan dengan menggunakan enzim fitase yang diproduksinya (Greiner and Sajidan, 2006). Hal tersebut diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Dwi Haryadi (2007) yang bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri *Pantoea agglomerans* penghasil fitase pada ransum dapat berpengaruh terhadap kualitas karkas ayam broiler. Pemberian bakteri *Pantoea agglomerans* penghasil fitase dalam ransum sampai level 10^5 CFU/ ml belum dapat meningkatkan kualitas karkas (Bobot Potong, Persentase Karkas, Persentase Potongan Karkas dan Persentase Lemak Abdominal) ayam broiler.

Berdasarkan penelitian diatas bukan berarti dari genus *Pantoea* tidak dapat menghasilkan enzim fitase dengan kualitas yang bagus, akan tetapi perlu dilakukan

penelitian-penelitian lagi yang bisa membuktikan bahwa dari genus *Pantoea* dapat menghasilkan enzim fitase termasuk bakteri *Pantoea stewartii subsp. Indologenes* yang berdasarkan penelitian sebelumnya dilaporkan memiliki indeks fitatik tertinggi kedua. Hal tersebut membuktikan bahwa *Pantoea stewartii subsp. Indologenes* memiliki daya hidrolisis fitat yang cukup baik yang dibuktikan dengan adanya zona bening.

Berdasarkan hasil penelitian di atas telah diketahui nama setiap spesies-spesies bakteri penghasil enzim fitase yang telah diisolasi dari setiap perwakilan masing-masing organ tanaman jagung (*Zea mays* L), setiap spesies bakteri yang teridentifikasi menunjukkan spesies yang berbeda-beda. Hal tersebut menunjukkan kekuasaan Allah swt. yang terbukti dalam al-Qur'an dalam QS. An-Nahl/14: 13 yang menyatakan bahwa "*Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya*". Kutipan terjemahan ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah swt. telah menciptakan segala jenis makhluk hidup dengan keanekaragaman jenisnya untuk dimanfaatkan manusia sebagaimana mestinya, termasuk dimanfaatkan oleh manusia untuk meningkatkan kualitas ternak dengan cara menggunakan bantuan bakteri sebagai penghasil fitase. Selain itu, dalam QS. Fathir ayat 28. juga dijelaskan tentang keragaman makhluk-makhluk hidup yang diciptakan oleh Allah swt. yaitu dalam kutipan ayat "*Mukhtalifun*". Allah juga menegaskan dalam QS. Fathir/35: 28 bahwa perbedaan yang terjadi pada makhluk hidup itu dikarenakan faktor genetis yang menyusun makhluk hidup yaitu DNA.

Dimana dengan informasi DNA, seorang ilmuwan bisa mengetahui spesies bakteri penghasil fitase agar lebih mudah dalam mempelajari bahwa makhluk yang diciptakan oleh Allah swt. semua memiliki manfaat dan kegunaan masing-masing.

Dalam kehidupan ini ada 3 yang perlu diperhatikan dalam hal output atau keterkaitan terhadap suatu penelitian yaitu iman, ibadah dan akhlak.

1. Iman kepada Allah swt., dapat menunjukkan kepada kita bahwa Allah swt. tidak pernah menciptakan sesuatu dengan sia-sia, semua ada manfaatnya, termasuk bakteri yang merupakan makhluk hidup mikroskopis yang berada dalam tanaman jagung (*Zea mays* L.). Iman juga bisa mengingatkan kita tentang keteraturan (qada') yang ada di alam semesta ini yaitu penciptaan makhluk Allah swt. termasuk penciptaan bakteri penghasil fitase yang telah diatur oleh Allah swt. dapat memecah asam fitat yang berguna dalam peningkatan kualitas hewan ternak, selain tentang keteraturan, dalam iman juga ada iman kepada al-Qur'an, dimana ayat-ayatnya terbukti bahwa Allah menciptakan makhluk-makhluknya dengan berbagai jenis dan bermacam-macam warnanya, yang telah terbukti oleh penelitian tentang adanya bakteri penghasil fitase yang memiliki jenis yang berbeda-beda yang mewakili organ-organ tanaman jagung (*Zea mays* L.) yaitu akar, batang, daun dan biji.
2. Ibadah merupakan cara kita untuk mendekatkan diri kepada Allah swt.. Dengan adanya penelitian ini, maka kita akan semakin menyadari bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah swt. memiliki manfaat untuk manusia. Oleh karena itu, kita akan semakin menyadari bahwa Allah swt. memiliki kekuasaan dan kebesaran

dalam hal penciptaan alam semesta ini termasuk penciptaan bakteri penghasil fitase, karena bakteri tersebut dapat diperoleh dari alam yaitu dari tanaman jagung (*Zea mays* L.), dimana selama ini umat manusia hanya mengetahui manfaat dari jagung itu sendiri, mereka belum mengetahui makhluk hidup yang ada di dalam jagung yang ternyata bisa sangat bermanfaat dalam dunia peternakan khususnya peternakan hewan monogastrik. Dengan hal ini, umat manusia akan semakin menyadari bahwa segala sesuatu yang Allah ciptakan tidak sia-sia dan umat manusia akan bisa semakin mendekatkan diri kepada Allah swt..

3. Dengan adanya penelitian ini, manusia bisa meningkatkan nilai-nilai akhlak yang ada seperti nilai-nilai akhlak sabar, teliti dan tekun. Karena sebuah penelitian mengajarkan kita untuk bisa bersikap sabar, memiliki ketelitian dan senantiasa tekun demi keberhasilan suatu penelitian. Dengan demikian penelitian akan semakin mendekatkan kita dengan nilai-nilai akhlak yang islami.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Berdasarkan perbedaan-perbedaan nama spesies bakteri penghasil fitase yang ditemukan, dapat menambah pengetahuan tentang biodiversitas bakteri di alam, dimana setiap hasil isolasi bakteri fitatik dari organ tanaman jagung (*Zea mays* L.) memberikan informasi spesies yang berbeda. Empat isolat bakteri yang memiliki indeks fitatik tertinggi yang masing-masing mewakili setiap organ tanaman jagung (*Zea mays* L.) yaitu isolat dari Akar 10^{-7} KL-7 dengan kode isolat HF 1, isolat biji 10^{-8} KL-1 dengan kode isolat HF 2, isolat daun 10^{-6} KL-3 dengan kode isolat HF 3 dan isolat batang 10^{-7} KL-2 dengan kode isolat HF 4. Setelah diidentifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa isolat HF 1 memiliki kesamaan 99% dengan *Burkholderia lata* strain 383, isolat biji HF 2 memiliki kesamaan 99% dengan *Enterobacter cloacae* subsp. dissolven Strain ATCC 23373, isolat HF 3 memiliki kesamaan 98% dengan *Enterobacter ludwigii* Strain EN-119 dan isolat HF 4 memiliki kesamaan 97% dengan *Pantoea stewartii* subsp. indologenes strain CIP 104006.

2. Hasil analisis filogenetik menggunakan sekuens DNA pengkode 16S-rRNA diketahui bahwa isolat HF 2 paling dekat dengan *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* strain ATCC 23373 dengan jarak genetik 0,02 (dekat) dan nilai bootstrap 86, isolat HF 3 paling dekat dengan *Enterobacter ludwigii* strain EN-119 dengan jarak genetik 0,02 (dekat) dan nilai bootstrap 87, isolat HF 4 memiliki kedekatan dengan *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* strain CIP 104006 dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai bootstrap 99 sedangkan isolat HF 1 paling dekat dengan *Burkholderia lata* strain 383 dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai bootstrap 100 dibandingkan dengan bakteri jenis lainnya yang ada di Gen Bank.

B. Saran

Adapun saran yang ingin saya sampaikan adalah sebagai berikut:

1. Sebaiknya isolat-isolat bakteri penghasil fitase yang telah diketahui spesiesnya untuk dikoleksi guna bisa digunakan untuk penelitian-penelitian yang relevan.
2. Bakteri-bakteri yang berhasil ditemukan yaitu *Burkholderia lata*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* dan *Pantoea stewartii* yang belum pernah dilaporkan menghasilkan enzim fitase bisa diusulkan menjadi bakteri baru penghasil enzim fitase dan dilakukan penelitian lanjutan seperti isolasi dan karakterisasi enzim fitase dari setiap spesies-spesies yang ditemukan serta mengkloningnya untuk produksi enzim fitase secara besar-besaran serta dari keempat isolat penghasil fitase tersebut dapat diuji kualitas

enzim fitase yang dihasilkan masing-masing isolat dengan cara mengaplikasikan enzim fitase pada pakan ternak.



KEPUSTAKAAN

- Arham, Washilul. Identifikasi Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal Asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember, 2015.
- Berg MJ, Tymoczko JL, and Stryer L. *Biochemistry*. Six Edition. San Fransisco: WH Freeman, 2007.
- Block, C. C., Hill, J. H., and McGee, D. C. Relationship between late-season severity of Stewart's bacterial wilt and seed infection in maize. *Plant Disease*. 83 (1999):527-530.
- Bradya, Stephanus Venter, Ilse Cleenwerck, Marc Vancanneyt, Jean Swings, Teresa Coutinho. A FAFLP system for the improved identification of plant-pathogenic and plant-associated species of the genus *Pantoea*. *Elsevier Systematic and Applied Microbiology* 30 (2007): 413–417.
- Brown, T.A. 2002. *Genomes*, 2nd Edition Oxford: Garland Science Ltd. ISBN-10: 0-471-25046-5.
- Brown, T.A. *Gene Cloning and DNA Analysis. An Introduction Sixth Edition*. Willey-Blacwell Published: Manchester, 2010.
- Campbell NA, Reece JB, and Mitchell LG. *Biologi*. Edisi ke-5. Penerjemah; Lestari R. Editor; Safitri. Jakarta: Erlangga, 2002. Terjemahan dari *Biology 6th Edition*.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, and Kjelleberg S. "Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies". *Applied and Environmental Microbiology* 73 no.1 (Januari 2007): 278-288.
- Chu HM, Guo RT, Lin TW, Chou CW, Shr HL, Lai HL, et al. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP

- phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*.12 (2000): 2015-2024.
- Dharmayanti, N.L.P. Indi. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Makalah Wartazoa*. 21 No. 1 (2011): 1-10.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., & Raoult, D. 16S ribosomal DNA Sequence Analysis a Large Collection Of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J Clin Microbiol*, 38, (2000): 3623-30.
- Gaffar, Sharbani. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Jurusan Kimia FMIPA: Universitas Padjajaran, 2007.
- Graf, E. Calcium binding to phytic acid. *J. Agric. Food Chem*, 31(1983): 851-855.
- Graminho, Eduardo Rezende, Naoki Takaya, Akira Nakamura,* and Takayuki Hoshino. urification, biochemical characterization, and genetic cloning of the phytase produced by Burkholderia sp. strain a13. *J. Gen. Appl. Microbiol* 61 (2015):15–23.
- Greiner, R. and Sajidan . Production of D-myo-inositol (1,2,4,5,6) pentakisphosphate using alginate-entrapped recombinant *Pantonea agglomerans* glucose I-phosphatse. *J. of Biotechnology* (Submit, 2006).
- Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K.D. Jany.. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys*. 341 (1997): 201-206.
- Hadietomo RS. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia, 1993.
- Han, X. Y., Pham, A.S., Tarrand, J.J., Sood, P. K., & Luthra, R. Rapid And Accurate Identification of Mycobacteria by Sequencing hypervariable Regions of The 16S ribosomal RNA Gene. *Am J Clin Pathol*, 118 (2002): 796-801.
- Haryadi, Dwi. Pengaruh Pemanfaatan Bakteri Penghasil Fitase (*Pantoea agglomerans*) Dalam Ransum Terhadap Kualitas Karkas Ayam Broiler. Tidak diterbitkan: *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret, 2007.

- Hidayat, Topik dan Adi Pancoro. Sistematika Dan Filogenetika Molekuler. *Kursus Singkat Aplikasi Peramgkat Lunak PAUP dan MrBayes untuk Penelitian Filogenetika Molekuler*, Bandung: Institut Teknologi Bandung, 2006.
- Hoffman, J. Stindl, H.S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, J., Schleifer, K.H. and Roggenkamp. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel Enterobacter species of clinical relevance. *Syst. Appl. Microbiol.* 28 no 3 (2005): 206-212.
- Irawan, Bambang. *Genetika Molekuler*. Surabaya: Airlangga University Press, 2008.
- Irving, G.C.J and D.J. Cosgrove. 1972. Inositol Phosphate Phosphatases of Microbiological Origin: the Inositol Pentaphosphate Products of *Aspergillus ficuum* Phytases. *J. Bacteriol* 112 (1): 434-438.
- Kerovuo, J. *A Novel Phytase from Bacillus: Characterization and Production of the Enzyme*, Ph.D dissertation, Univ. Helsinki, Finland, 2009.
- Kurnia, Tri Amalia, Mukhtar Iskandar Pinem, Syahrial Oemry. “Penggunaan Jamur Endofit untuk Mengendalikan *Fusarium oxysporum* f.sp. *capsici* dan *Alternaria solani* Secara *in Vitro*”. *Jurna online agroteknologi* 2 No.4 (September 2014): 1596 – 1606.
- Kusumadjaja, A.P. Skrening dan Karakterisasi Enzim Fitase Termofilik Hasil Isolasi dari Bawah Kawah Ijen Banyuwangi. Laporan Hibah Penelitian Program Doktor Universitas Airlangga, 2009.
- Labrador, K.L, E.L.T. Lustica and A.U. Novero. Isolation And Characterization Of Bacterial Endophytes Associated With Sago Palm (*Metroxylon Sagu* Rottb.) In Tissue Culture. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* 16 No. 4 (2014): 877-885.
- Lazado CC, Christopher MA, Caipang, Sanchala G, Monica F, Brinchmann, dan Viswanath K. “Responses of Atlantic cod *Gadus morhua* head kidney Leukocyte:”. *Journal Fish Physiol Biochem* 36 (2010):883–891.
- Lehninger AL. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 3. Terjemahan Maggy Thenawijaya dari *Principles of Biochemistry*. Jakarta: Erlangga, 1994.

- Liu, J., D.R. Ledoux and T.L. Veum. In Vitro Procedure For Predicting The Enzymatic Dephosphorylation of Phytate in Corn-Soybean Meal Diets for Growing Swine. *J.Agric. Food Chem.* 45 (1997): 2612-2617.
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J. 1997. Brock, the Biology of Microorganisms 8th Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey.
- Mangunwardoyo, Wibowo, Romauli Aya Sophia, dan Endang Sri Heruwati. Seleksi Dan Pengujian Aktivitas Enzim *L-Histidine Decarboxylase* Dari Bakteri Pembentuk Histamin. *J.Sains*, 11, No. 2 (2007): 104-109.
- Manz A, Nicole P, and Dimitri I. *Bioanalytical Chemistry*. London: Imperial College Press, 2004.
- Marchesi JR, sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, and Wade WG. “Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA”. *Applied and Environmental Microbiology* 64 no.2 (Februari 1998): 795-799.
- Mergaert, Johaness, Linda Verdonck, dan Karel Kersters, Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* comb. nov., Respectively, and Description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 No. 1 (Januari 1993): 162-173.
- Miao G, Jian-jiao Z, En-tao W, Qian C, Jing X, Jian-guang S. Multiphasic characterization of a plant growth promoting bacterial strain, *Burkholderia* sp. 7016 and its effect on tomato growth in the field. *Journal of Integrative Agriculture*. 14 No. 9 (2015): 1855-1863
- Mirabella, Flora Monica. Pendekatan Pohon dalam Filogenetik. *Makalah ITB*. Institut Teknologi Bandung: Program Studi Teknik Informatika, 2012.
- Muladno. *Seputar Teknologi rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda, 2002.
- Murray RK, Granner DK, dan Rodwell VW. *Biokimia*. Jakarta: EGC, 2003.

- Nagashia, T., T. Tange, and H Anazawa.. Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate. *Appl environ Microbiol* 65 no. 10 (1999): 4682-4684.
- Natsir H, Chandra D, Suhartono MT, Hwang JK, dan Pyun YR. *Eksplorasi Mikroba Asidofilik Penghasil Enzim Kitinase Asal Kawah Kamojang Jawa Barat*. Prosiding 11 Seminar Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor, 1999.
- Novel, Sinta Sasika, Dr. (Eng) Sukma Nuswantara, dan Dra. Supartini Syarif. *Genetika Laboratorium*. Bandung: CV. Trans Info Media, 2010.
- Ochman H. *Genomes on the Shrink*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). 102 no. 34 (2005): 11959-11960.
- Pangastuti, Artini. 2006. Review Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan UrutanBasa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Jurnal ISSN: 1412-033X*, 292-296.
- Radji, M. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2 No.3 (2005): 113-126.
- Rombola TH, Pedrinho EAN, Lemos EGM, Goncalves AM, Santos LFJ, Jr JMP. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. *BMC Research Notes*. 7 (2014): 221
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacteria endophytes: recent developments and applications. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*. 278 (2007): 1-9.
- S., Sreedevi dan Reddy B.N. "Identification of Phytase producing Bacteria C43 isolated from cattle shed soil samples of Hyderabad, A.P". *Helix* Vol. 1 (2013): 238-242.
- Sajidan, A. Farouk, R. Greiner, P. Jungblut, E.C. Muller, R. Borriss. 2004. Moleculer and Physioloical characterization of a 3- Phytase from Soil Bacterium *Kleibsiella* sp ASRI. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65 (1): 110-118.

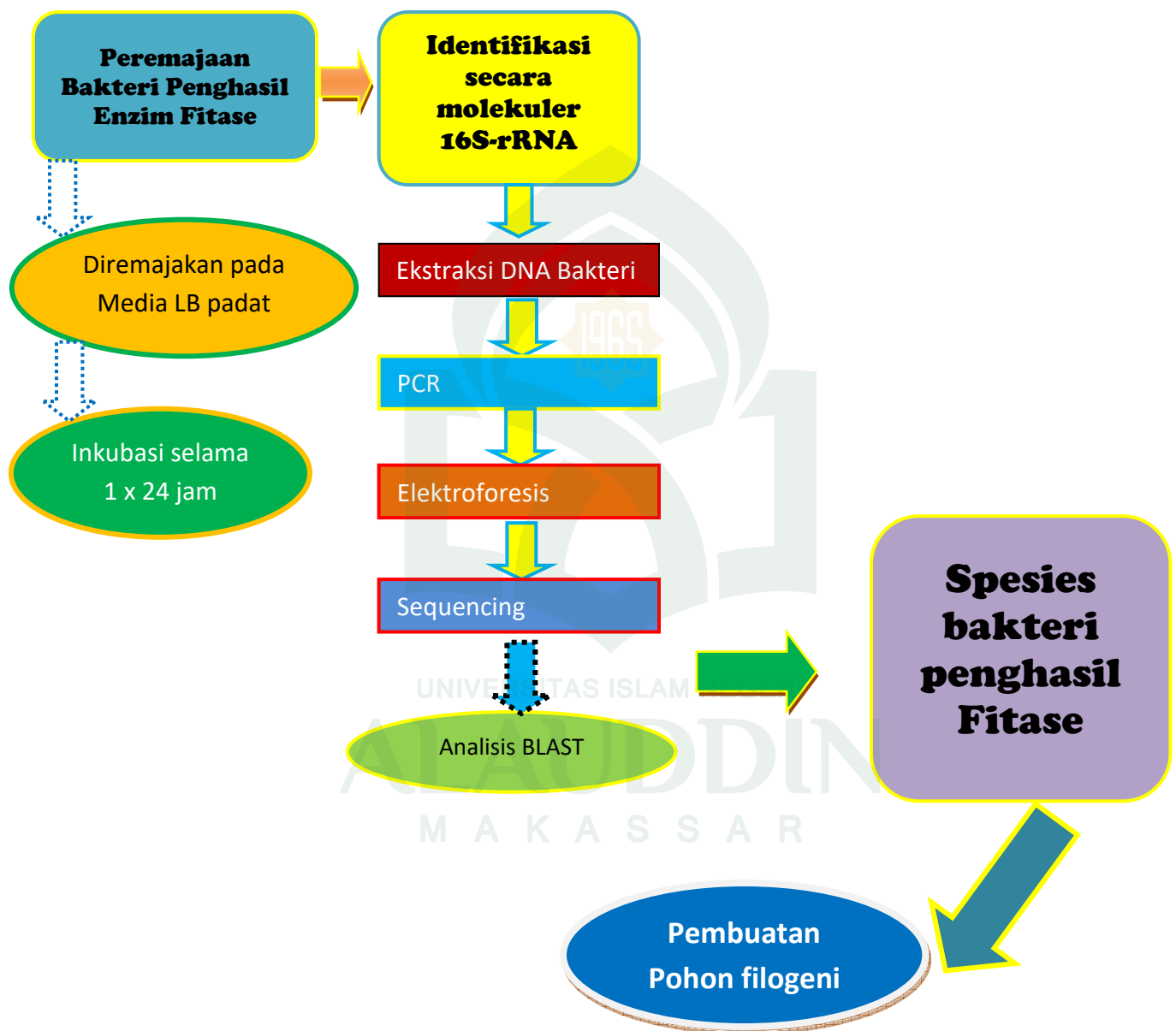
- Sajidan, Rita Wulandari, Evy Novita Sari, Adi Ratriyanto, Hailu Weldekiros and Ralf Greiner. "Phytase-Producing Bacteria from Extreme Regions in Indonesia. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 58 no. 1 (2015): 711-717.
- Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York: Colpspring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch 7 T. Maniatis. *Moleculer Cloning A Laboratory Manual*, Ed ke-2. USA: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A, R. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*. Vol. 74 (12): 5436-5476.
- Sari IP. "Analisis Keragaman Genetik Bakteri Endofitik dan Filosfer Padi dengan Teknik ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)". *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB, 2006.
- Sari, Evy Novita, Sajidan dan Sugiarto. Identifikasi Bakteri Penghasil Fitase Dan Karakterisasi Fitase Dari Kawah Sikidang Dieng. *El-Vivo*. 1 no. 1 (2013): 34-44.
- Sari, Evy Novita. Identifikasi Bakteri Penghasil Fitase Berdasarkan Gen 16S rRNA dan Karakterisasi Fitase dari Kawah Sikidang Dieng. Tidak diterbitkan: *Tesis*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret, 2012.
- Sarusutha IG. P. Kinerja Usaha Tani dan Pemasaran Jagung di Sentra Produksi. *Jurnal Litbang Pertanian*. 21 no. 2 (2002): 39-47.
- Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, and Yonath A. "Structure of Functionally Activited Small Ribosomal Subunit at 3.3 A Resolution". *Cell* 102 no.5 (2000): 615-623.
- Schobitz M, Ribaudo C, Ciampi L and Poncelet D. 2007. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolatd from *Lolium*

- perenne L. Rhizosphere. VXth International Workshop on Bioencapsulation, Viena.
- Shihab, M. Quraish. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati, 2002.
- Singleton P. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 3rd Edition. New York: John Wiley and Sons, 1995.
- Stansfield, Wiliam, Raul Cand dan Jaime Colome. *Biologi Molekuler dan Sel*. Jakarta: Erlangga, 2006.
- Suyanto, D. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler . *Skripsi*. Medan: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara, 2003.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. CLUSTAL W: improving *thesentivity* of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1993):4673–4680.
- Tuminem. Nematoda Puru Akar Pada Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.) Dan Potensi Bakteri Probiotik Tanaman Sebagai Agens Biokontrol : Studi Kasus Di Papua Barat. *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB, 2016.
- Unno, Y., Okubo, K., Wasaki, J., Shinano, T., and Osaki, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynam-ics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization abil-ity. *Environ. Microbiol.*, 7, No. 396 ((2005): 40.
- Vanlaere , Elke, Adam Baldwin, Dirk Gevers, Deborah Henry, Evie De Brandt, John J. LiPuma, Eshwar Mahenthiralingam, David P. Speert, Chris Dowson and Peter Vandamme. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* No. 59 (2009): 102–111.

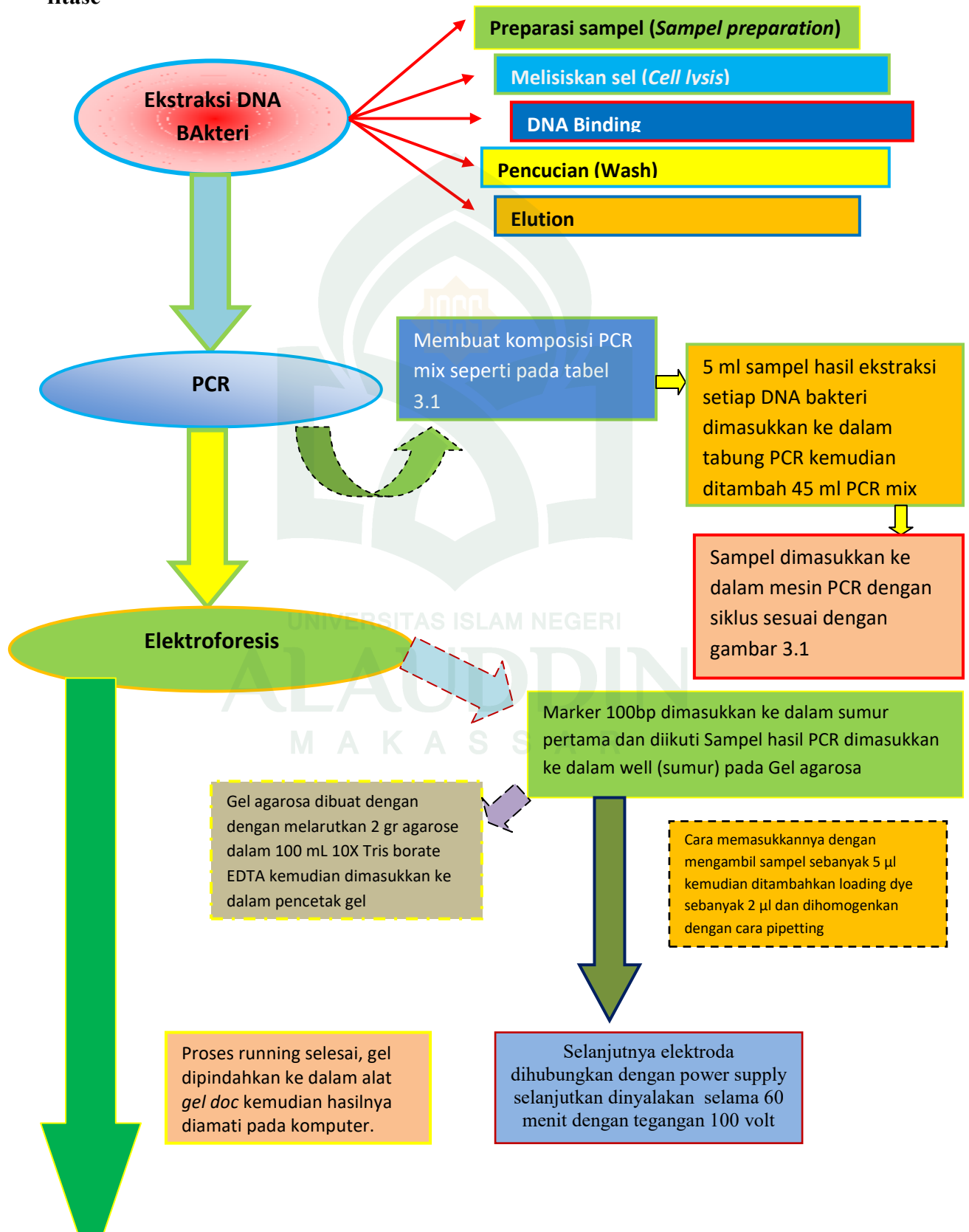
- Weising K, Nybom H, Wolff K, and Kahl G. *DNA Fingerprinting in Plants; Principles, Methods, and Applications*. 2nd Edition, Boca Raton (US): CRC Press, 2005.
- Wulandari, Rita. Analisis Gen 16S rRNA Pada Bakteri Penghasil Enzim Fitase. Tidak diterbitkan: *Tesis*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret, 2015.
- Yoon, S.J., Y. J. Choi. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee, and Y. H. Jung. Isolation and identification of phytase-producing bacterium , *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbiology and Technology* 18: (1996): 449-454.
- Yuwono, T. *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga, 2005.
- Yuwono, T. teori dan Aplikasi: PCR. Yogyakarta: Penerbit Andi, 2006.

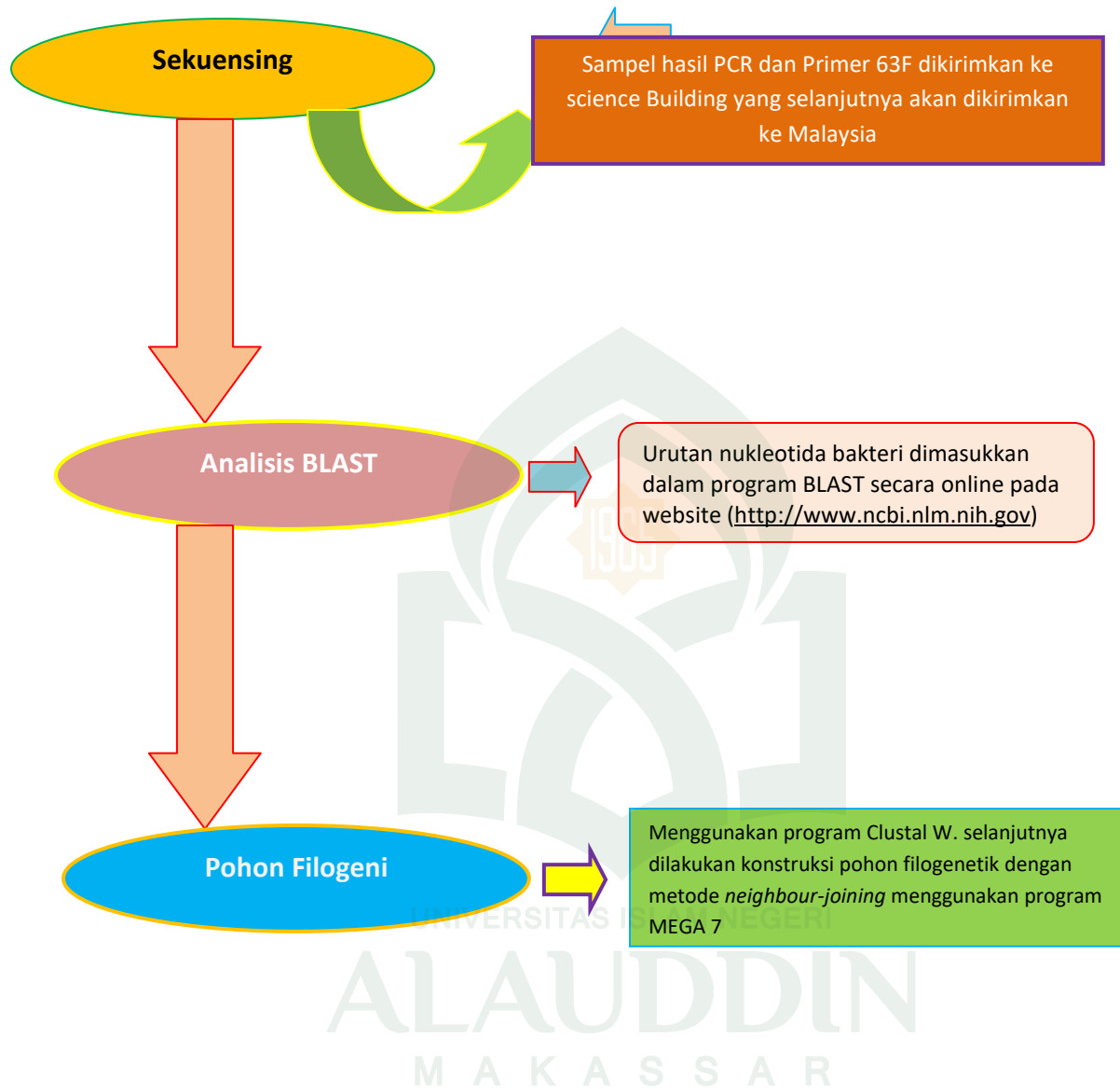
LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Penelitian



Lampiran 2. Tahapan-tahapan identifikasi molekuler bakteri endofit penghasil fitase

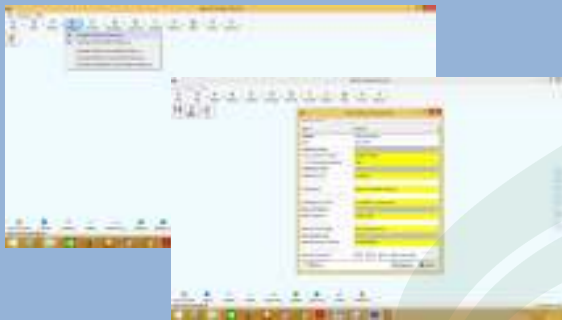




Lampiran 3. Alur Kerja Pembuatan Pohon Filogeni

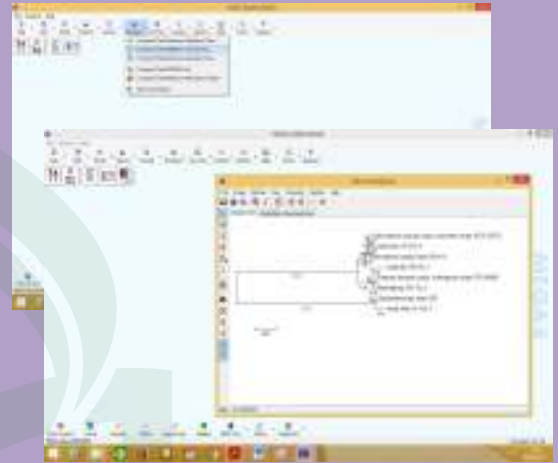


Kembali ke site pertama, klik
Distance→compute pairwise distances (input
file ekstensi tadi) → klik open



Untuk variance estimation method pilih yang
Bootstrap method 1000→klik Compute

Kembali ke site pertama , klik
Phylogeny→pilih construct/tes neighbor→
Joining tree



Lampiran 4. Alat dan Bahan Penelitian

➤ 4.1 Alat-alat penelitian



➤ 4.2 Bahan-bahan penelitian



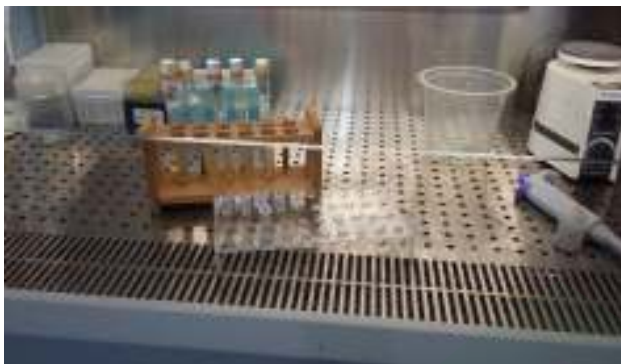
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

Peremajaan Isolat Bakteri Penghasil Enzim Fitase Terpilih

Proses peremajaan isolat-isolat bakteri endofit dilakukan pada media LB (Luria Bertani) padat



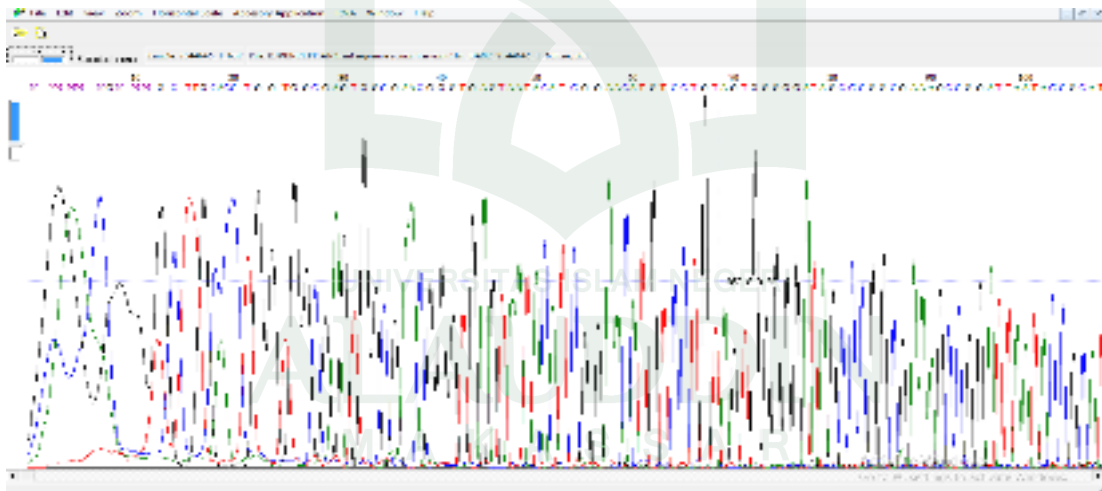
Hasil Peremajaan
isolat-isolat Bakteri



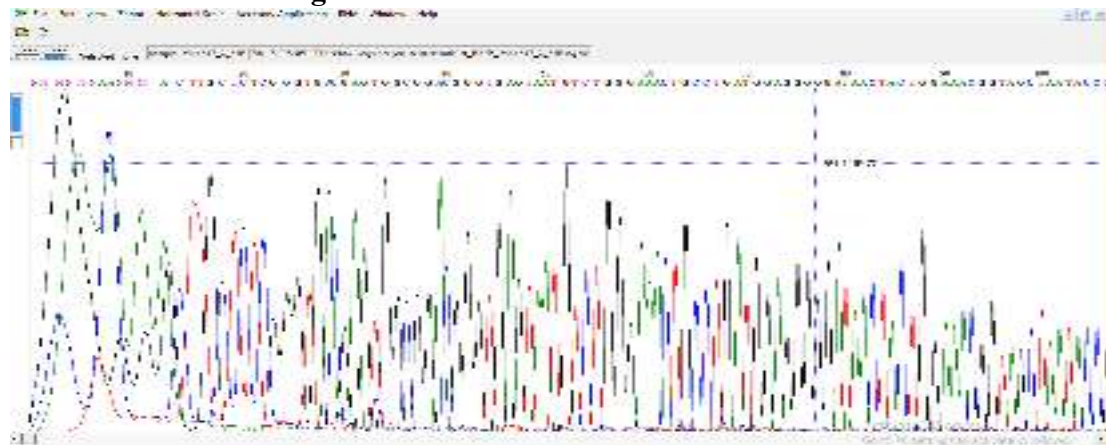


Lampiran 6. Hasil sekuensing keempat isolat Bakteri

➤ 6.1 Hasil Sekuensing isolat HF 1



➤ 6.2 Hasil Sekuensing isolat HF 2



RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Desa Mulyasri Kec. Tomoni Kab. Luwu Timur pada tanggal 19 Juni 1995, dan diberi nama **Yuniar Harvianti**. Penulis dilahirkan dalam keluarga sederhana dari pasangan suami isteri **Guntoyo** dan **Ruwet Hartini**. Penulis berasal dari Desa Mulyasri Kec. Tomoni Kab. Luwu Timur provinsi Sulawesi Selatan. Di dalam keluarganya penulis merupakan anak Tunggal. Riwayat pendidikan yaitu, **SDN 170 Mulyasri** pada tahun 2001. Penulis melanjutkan sekolah di **SMPN**

1 Mangkutana. Setelah tiga tahun Penulis berada di kursi sekolah menengah atas tepatnya di **SMAN 1 Mangkutana**, Penulis kemudian melangkah ke Perguruan Tinggi Negeri di Makassar yaitu **Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar** melalui jalur UMM tahun 2013, **Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi**.

Selama menjadi Mahasiswa Penulis aktif menjadi asisten praktikum di Laboratorium Biologi. Kemudian penulis juga PKL di Laboratorium NECHRI RS. Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Biologi Molekuler RSP UNHAS dan mengikuti KKN UINAM angkatan 53 di Desa Lassa-Lassa Kec. Bontolempangan. Terakhir penulis membuat skripsi dengan judul “Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Fitase Asal Tanaman Jagung (*zea mays* L.) Berbasis Gen 16S rRNA”. Semoga segala ilmu yang diperoleh selama masa perkuliahan bermanfaat dan menjadi anak yang shaleh serta sukses berkat bantuan dari orang tua tercinta dan semua yang ikut serta dalam masa pendidikan penulis. Aamiin ya Robb.....